

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE DNA EXTRACELULAR EN  
*Bacillus subtilis* Y ESTUDIO DE SU DISTRIBUCIÓN EN LOS CUERPOS  
AÉREOS**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Microbiología

Alejandra López Ibáñez de Aldecoa

DIRECTOR DE TESIS: José Eduardo González Pastor

Madrid, 2018



**CENTRO DE ASTROBIOLOGÍA**  
ASOCIADO AL NASA ASTROBIOLOGY INSTITUTE



**CSIC**



Las ilustraciones en acuarela utilizadas en la separación de apartados han sido realizadas por María Lamprecht Grandío

## ***AGRADECIMIENTOS***

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo de numerosas personas con las que he tenido la enorme suerte de poder contar y a las que, en agradecimiento, quiero dedicar este apartado.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Eduardo González por dirigir esta Tesis Doctoral, por su apoyo y confianza en mi trabajo y en mis ideas, y en especial, por el tiempo dedicado en mi formación y desarrollo profesional.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. César Menor por creer en mí y darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación.

Así mismo, agradecer a mi tutor de Tesis, el Dr. Ricardo Amils, por aceptar tutelar este trabajo.

I would like to thank Prof. Peter Graumann for accepting me in his laboratory during an internship that I really enjoyed, both personally and professionally.

Agradezco de manera especial a Carolina González su profesionalidad, su generosidad y su amistad. Has sido un apoyo fundamental para mí.

En estos agradecimientos quiero destacar también al resto de personas con las que he compartido el laboratorio, porque siempre hubo un ambiente maravilloso y porque me llevo grandes amistades. Entre ellas a mi predecesora y guía en el mundo de subtelis, además de gran artista, la Dra. María Lamprecht. Muchas gracias por todos los buenos momentos vividos y por tu alegría. No me olvido de los Drs. Olga Zafra, Verónica Morgante y Salvador Mirete. Ha sido una suerte poder conocerlos y un lujo aprender de vosotros. Gracias porque todos me habéis ayudado y enseñado con paciencia y amabilidad.

¡Qué decir de mis CABernícolas! Ha sido genial compartir estos años con todos vosotros, sois grandes personas y grandes profesionales. Nunca olvidaré tantísimos buenos momentos que hemos pasado juntos y ojalá que queden muchos más. No puedo cerrar este apartado sin hacer una mención especial a mis compañeras de penas y alegrías Margot y Nuria.

Por último, quiero agradecer también a mis amigos y familiares por su apoyo incondicional. En especial a mis padres, M<sup>a</sup> Ángeles y Jesús, y a mi hermano Jesús porque sin vosotros no sería la persona que soy ahora. Para mí siempre habéis sido un ejemplo de superación, constancia, generosidad y honestidad. Deciros gracias se queda infinitamente corto.

Finalmente agradecer a Álvaro, la persona que día tras día me hace feliz, que me acompaña en la vida compartiendo los momentos de alegría y de debilidad. Porque a tu lado no existen los sueños imposibles y porque sin ti no habría llegado hasta aquí.

# INDICE GENERAL

<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>i</b>	<b>1. Materiales.....</b>	<b>26</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>v</b>	<b>1.1 Estirpes bacterianas.....</b>	<b>26</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>	<b>1.2 Bacteriófagos utilizados en este trabajo</b>	<b>28</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>	<b>1.3 Plásmidos utilizados en este trabajo .....</b>	<b>28</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>	<b>1.4 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo</b>	<b>29</b>
<b>1. Producción de DNA extracelular (eDNA) .....</b>	<b>3</b>	<b>1.5 Medios de cultivo y antibióticos .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1 Producción de eDNA en bacterias .....</b>	<b>3</b>	<b>2. Métodos.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.1 Pseudomonas aeruginosa .....</b>	<b>3</b>	<b>2.1 Manipulación y condiciones de cultivos</b>	<b>30</b>
<b>1.1.2 Neisseria gonorrhoeae .....</b>	<b>4</b>	<b>2.1.1 Conservación de las cepas bacterianas</b>	<b>31</b>
<b>1.1.3 Streptococcus pneumoniae .....</b>	<b>5</b>	<b>2.1.2 Condiciones de cultivo planctónico para</b>	<b>31</b>
<b>1.2 Producción de eDNA en B. subtilis.....</b>	<b>5</b>	<b>la producción de eDNA en B. subtilis .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.1 Producción de eDNA en cultivos</b>	<b>6</b>	<b>2.1.3 Transformación bacteriana .....</b>	<b>31</b>
<b>planctónicos .....</b>	<b>6</b>	<b>2.1.3.1 Transformación de células no</b>	<b>31</b>
<b>1.2.2 eDNA en el contexto de las comunidades</b>	<b>10</b>	<b>competentes, E. coli.....</b>	<b>31</b>
<b>multicelulares de B. subtilis.....</b>	<b>10</b>	<b>2.1.3.2 Transformación de células</b>	<b>32</b>
<b>1.2.2.1 Formación de comunidades</b>	<b>10</b>	<b>competentes de B. subtilis .....</b>	<b>32</b>
<b>multicelulares o biopelículas por B. subtilis</b>	<b>10</b>	<b>2.1.4 Transducción en mutantes no</b>	<b>33</b>
<b>.....</b>	<b>10</b>	<b>competentes de B. subtilis .....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.2.2 El eDNA no es necesario para la</b>	<b>12</b>	<b>2.1.5 Pruebas de motilidad: swimming y</b>	<b>33</b>
<b>formación de comunidades multicelulares</b>	<b>12</b>	<b>swarming .....</b>	<b>33</b>
<b>en B. subtilis .....</b>	<b>12</b>	<b>2.2 Técnicas de biología molecular.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Otros tipos de diferenciación celular en B.</b>	<b>13</b>	<b>2.2.1 Aislamiento de ácidos nucleicos .....</b>	<b>34</b>
<b>subtilis .....</b>	<b>13</b>	<b>2.2.1.1 Cuantificación de la concentración de</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Desarrollo de la motilidad .....</b>	<b>16</b>	<b>eDNA en cultivos planctónicos de B. subtilis</b>	<b>34</b>
<b>2.1.1 Desarrollo del flagelo en B. subtilis .....</b>	<b>16</b>	<b>.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1.2 Tipos de motilidad .....</b>	<b>20</b>	<b>2.2.1.2 Aislamiento y cuantificación de DNA</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Desarrollo de la competencia .....</b>	<b>21</b>	<b>cromosómico de B. subtilis .....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>		
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>		

2.2.1.3 Aislamiento y cuantificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	35
2.2.1.4 Aislamiento y cuantificación de RNA de <i>B. subtilis</i> .....	35
2.2.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	35
2.2.3 Ligación de DNA.....	35
2.2.4 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) .....	35
2.2.5 Electroforesis de DNA y RNA.....	36
2.2.6 Secuenciación de DNA .....	36
2.3 Análisis de actividades enzimáticas.....	37
2.3.1 Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa	37
2.4 Construcción de mutantes .....	37
2.5 Microarrays de DNA .....	39
2.5.1 Preparación de DNAs marcados con fluorescencia.....	39
2.5.2 Análisis de los datos de microarrays de DNA.....	40
2.6 Visualización de células planctónicas y colonias (biopelículas) mediante microscopía de fluorescencia, confocal y de barrido electrónico .....	40
2.6.1 Preparación de muestras y marcaje fluorescente .....	40
2.6.1.1 Muestras de cultivo planctónico.....	40
2.6.1.2 Muestras de colonias (biopelículas) .	41
2.6.2 Visualización de muestras y conteo de células con Microscopía de Fluorescencia	41
2.6.3 Experimentos de Microscopía Confocal	42
2.6.4 Experimentos de Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura (LT-SEM).	42

## CAPÍTULO 1: NUEVAS IMPLICACIONES DE COMS EN LA PRODUCCIÓN DE EDNA Y SU POSIBLE PAPEL EN OTROS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR .....

1. ComS es necesario para la producción de eDNA .....	44
1.1 La expresión de comS complementa parcialmente el defecto de producción de eDNA en un mutante $\Delta$ comS.....	44
1.2 La sobreexpresión de comS produce un incremento en la producción de eDNA .....	46
1.3 Un mutante en comS tiene afectada la producción de eDNA .....	47
2. Perfil transcripcional del mutante $\Delta$ comS.	48
2.1 Genes Inhibidos en el mutante $\Delta$ comS....	49
2.2 Genes inducidos en el mutante $\Delta$ comS...	53
3. Conclusiones.....	53

## CAPÍTULO 2: IMPLICACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE EDNA EN *B. subtilis*. .....

1. En ausencia de motilidad se inhibe la producción de eDNA .....	56
1.1 La producción de eDNA se relaciona con el desarrollo de flagelos funcionales .....	56
1.2 La ausencia de motilidad afecta a la acumulación de DNA en una subpoblación de células .....	57
1.3 Implicación de las autolisinas reguladas por $\sigma^D$ en la producción de eDNA .....	60
2. Relación entre los procesos de motilidad y competencia.....	61
2.1 La ausencia de motilidad no afecta a la competencia temprana.....	62
2.2 Las señales de quorum sensing (QS) no afectan al desarrollo de la motilidad .....	64

3. Análisis del perfil transcripcional de mutantes en motilidad mediante microarrays .....	66
3.1 Perfil transcripcional de 3610 $\Delta$ swrA::tet	67
3.2 Perfil transcripcional de 3610 motAB::tet .....	69
3.3 Comparación entre los perfiles transcripcionales de motAB y $\Delta$ swrA .....	71
4. Conclusiones .....	74
<b>CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE eDNA EN LOS CUERPOS AÉREOS DE <i>B. subtilis</i> 3610 .....</b>	<b>75</b>
1. Marcaje del eDNA en los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> .....	75
2. Organización celular en los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> .....	78
2.1 Las células en el interior de los cuerpos aéreos forman estructuras organizadas ...	78
2.2 Las células en el interior de los cuerpos aéreos se organizan formando conductos	81
3. Localización de subpoblaciones celulares en los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> : las células con motilidad se distribuyen por el interior de los cuerpos aéreos .....	85
4. Conclusiones .....	89
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>91</b>

1. ComS regula la producción de eDNA .....	91
2. ComS: molécula reguladora implicada en múltiples procesos .....	95
2.1 Regulación de la motilidad .....	95
2.2 La regulación de comS afecta a diversos procesos de diferenciación celular.....	96
3. La motilidad es necesaria para la producción de eDNA .....	98
4. Motilidad y competencia: dos procesos excluyentes pero interdependientes. ....	103
5. Modelo de diferenciación celular y exportación del DNA en células productoras .....	105
6. Localización del eDNA en los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> 3610.....	108
7. Las células con motilidad se desplazan por el interior de los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> 3610 .....	110
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>129</b>
ANEXO I.....	129
ANEXO II.....	131
ANEXO III.....	159

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA 1</b>	Producción de eDNA en <i>B. subtilis</i>	<b>7</b>
<b>FIGURA 2</b>	Fenotipo del mutante espontáneo extendido	<b>7</b>
<b>FIGURA 3</b>	Activación de la competencia temprana	<b>8</b>
<b>FIGURA 4</b>	Comunidades multicelulares formadas por <i>B. subtilis</i>	<b>10</b>
<b>FIGURA 5</b>	Mecanismos de regulación de la diferenciación celular	<b>14</b>
<b>FIGURA 6</b>	Representación de los distintos tipos de diferenciación celular en <i>B. subtilis</i>	<b>15</b>
<b>FIGURA 7</b>	Estructura del flagelo de <i>B. subtilis</i>	<b>16</b>
<b>FIGURA 8</b>	Regulación de los genes implicados en la formación del flagelo	<b>19</b>
<b>FIGURA 9</b>	Morfología de las células <i>swarmers</i>	<b>20</b>
<b>FIGURA 10</b>	Regulación de la competencia tardía e implicación de CodY	<b>22</b>
<b>FIGURA 11</b>	Esquema explicativo de la mutagénesis mediante técnica LFH-PCR	<b>37</b>
<b>FIGURA 12</b>	La producción de eDNA y la competencia en el mutante <i>srfAC</i> se complementa parcialmente con una copia de <i>comS</i> en el locus <i>amyE</i>	<b>44</b>
<b>FIGURA 13</b>	La sobreexpresión de <i>comS</i> aumenta la producción de eDNA y la transformabilidad de <i>B. subtilis</i>	<b>46</b>
<b>FIGURA 14</b>	Implicación de <i>comS</i> en la producción de eDNA	<b>47</b>
<b>FIGURA 15</b>	Asignación funcional de los genes que se expresan diferencialmente en el mutante $\Delta comS$ en relación con la estirpe silvestre	<b>49</b>
<b>FIGURA 16</b>	Genes relacionados con el metabolismo que presentan expresión en el mutante $\Delta comS::spc$ en relación a la estirpe silvestre	<b>50</b>
<b>FIGURA 17</b>	Mutantes afectados en motilidad no producen eDNA	<b>56</b>
<b>FIGURA 18</b>	Efecto de las mutaciones <i>hag</i> , $\Delta swrA$ y <i>motAB</i> en la síntesis de eDNA	<b>58</b>
<b>FIGURA 19</b>	Efecto de las mutaciones $\Delta swrA$ y $P_{spank}\text{-}swrA$ en la producción de eDNA	<b>59</b>

<b>FIGURA 20</b>	Efectos de las mutaciones <i>lytC</i> , <i>lytF</i> , <i>lytD</i> y <i>lytCDF</i> en la producción de eDNA	<b>60</b>
<b>FIGURA 21</b>	Los mutantes en motilidad tienen afectada la competencia	<b>61</b>
<b>FIGURA 22</b>	La síntesis de surfactina no está relacionada con la motilidad	<b>62</b>
<b>FIGURA 23</b>	Efecto de las mutaciones en $\Delta swrA$ y <i>hag</i> sobre la expresión del operón de la surfactina ( <i>srf</i> )	<b>62</b>
<b>FIGURA 24</b>	La motilidad no se ve afectada por la disrupción de los receptores de <i>quorum sensing</i>	<b>64</b>
<b>FIGURA 25</b>	La mutación en <i>comP</i> no afecta a la motilidad	<b>64</b>
<b>FIGURA 26</b>	Representación según la función biológica de los genes que presentan expresión diferencial entre el mutante 3610 $\Delta swrA::tet$ y la estirpe silvestre 3610	<b>66</b>
<b>FIGURA 27</b>	Representación según la función biológica de los genes que presentan expresión diferencial entre el mutante 3610 <i>motAB::tet</i> y la estirpe silvestre 3610	<b>68</b>
<b>FIGURA 28</b>	Comparación entre los perfiles transcripcionales de los mutantes $\Delta swrA$ y <i>motAB</i>	<b>70</b>
<b>FIGURA 29</b>	Marcaje de DNA en células vivas y muertas en los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i>	<b>75</b>
<b>FIGURA 30</b>	Organización de la estructura de las comunidades multicelulares formadas por <i>B. subtilis</i>	<b>77</b>
<b>FIGURA 31</b>	Estructura interna de los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> 3610	<b>78</b>
<b>FIGURA 32</b>	Organización celular en forma de conductos en el interior de los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> 3610	<b>80</b>
<b>FIGURA 33</b>	Diferencias en la organización celular en el margen de la colonia en la estirpe silvestre 3610 y el mutante 3610 <i>yveQ::tet</i>	<b>81</b>
<b>FIGURA 34</b>	La complejidad en la organización celular interna es inferior en el mutante <i>yveQ</i> frente a la estirpe silvestre 3610	<b>82</b>
<b>FIGURA 35</b>	Distribución de las células con motilidad en el margen de la colonia de <i>B. subtilis</i> 3610 $P_{hag}-gfp$	<b>84</b>
<b>FIGURA 36</b>	Las células con motilidad se localizan en el interior de los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i>	<b>85</b>
<b>FIGURA 37</b>	Distribución espacial de las células móviles en los cuerpos aéreos	<b>86</b>



de *B. subtilis* 3610  $P_{hag-gfp}$

<b>FIGURA 38</b>	Detalle de la distribución lineal de las células con motilidad en los cuerpos aéreos de <i>B. subtilis</i> 3610 $P_{hag-gfp}$	<b>87</b>
<b>FIGURA 39</b>	Regulación de la motilidad por los factores de competencia	<b>90</b>
<b>FIGURA 40</b>	Regulación de las proteínas Rap	<b>95</b>
<b>FIGURA 41</b>	Procesos celulares y genes afectados por ComS	<b>95</b>
<b>FIGURA 42</b>	Las proteínas transmembrana MotA y B inhiben la síntesis de PGA	<b>97</b>
<b>FIGURA 43</b>	La inhibición de la rotación del flagelo inhibe la producción de eDNA y la competencia	<b>98</b>
<b>FIGURA 44</b>	Regulación del activador de la competencia ComK	<b>101</b>
<b>FIGURA 45</b>	Posible ruta de regulación que gobierna la producción de eDNA en <i>B. subtilis</i>	<b>104</b>
<b>FIGURA 46</b>	Regulación de Spo0A	<b>105</b>
<b>FIGURA 47</b>	Diferencias entre macro y micro-conductos	<b>109</b>
<b>FIGURA 48</b>	Distribución de las células con motilidad en una colonia de <i>B. subtilis</i> a lo largo de su desarrollo	<b>110</b>

---

<b>TABLA 1</b>	Cepas de <i>B. subtilis</i> usadas en este trabajo	<b>25</b>
<b>TABLA 2</b>	Cepa de <i>E. coli</i> usada en este trabajo	<b>26</b>
<b>TABLA 3</b>	Fagos utilizados en este trabajo	<b>27</b>
<b>TABLA 4</b>	Plásmidos utilizados en este trabajo	<b>27</b>
<b>TABLA 5</b>	Oligonucleótidos usados en este trabajo	<b>28</b>
<b>TABLA 6</b>	Genes inhibidos en común entre los perfiles transcripcionales de los mutantes $\Delta swrA$ y $\Delta motAB$	<b>70</b>
<b>TABLA 7</b>	Genes inducidos en común entre los perfiles transcripcionales de los mutantes $\Delta swrA$ y $\Delta motAB$	<b>71</b>
<b>TABLA 8</b>	Relación entre la producción de surfactina y motilidad tipo	<b>94</b>

*swarming* en distintos mutantes

<b>TABLA 9</b>	Microorganismos productores de eDNA	<b>127</b>
<b>TABLA 10</b>	Genes inhibidos en el mutante 3610 $\Delta comS::spc$ a las 5:30h de cultivo frente al 3610	<b>129</b>
<b>TABLA 11</b>	Genes inducidos en el mutante 3610 $\Delta comS::spc$ a las 5:30h de cultivo frente al 3610	<b>133</b>
<b>TABLA 12</b>	Genes inhibidos en el mutante 3610 $\Delta comS::spc$ a las 6h de cultivo frente al 3610	<b>136</b>
<b>TABLA 13</b>	Genes inducidos en el mutante 3610 $\Delta comS::spc$ a las 6h de cultivo frente al 3610	<b>141</b>
<b>TABLA 14</b>	Genes inhibidos en el mutante 3610 $\Delta swrA::tet$ a las 5h de cultivo frente al 3610	<b>144</b>
<b>TABLA 15</b>	Genes inducidos en el mutante 3610 $\Delta swrA::tet$ a las 5h de cultivo frente al 3610	<b>146</b>
<b>TABLA 16</b>	Genes inhibidos en el mutante 3610 $\Delta swrA::tet$ a las 6h de cultivo frente al 3610	<b>147</b>
<b>TABLA 17</b>	Genes inducidos en el mutante 3610 $\Delta swrA::tet$ a las 6h de cultivo frente al 3610	<b>149</b>
<b>TABLA 18</b>	Genes inhibidos en el mutante 3610 $\Delta motAB::tet$ a las 5h de cultivo frente al 3610	<b>150</b>
<b>TABLA 19</b>	Genes inducidos en el mutante 3610 $\Delta motAB::tet$ a las 5h de cultivo frente al 3610	<b>151</b>
<b>TABLA 20</b>	Genes inhibidos en el mutante 3610 $\Delta motAB::tet$ a las 6h de cultivo frente al 3610	<b>154</b>
<b>TABLA 21</b>	Genes inducidos en el mutante 3610 $\Delta motAB::tet$ a las 6h de cultivo frente al 3610	<b>155</b>

## ABREVIATURAS

A: absorbancia	GGI: Isla genética gonococal
AHLs: lactona N-acetil homoserinas	GTP: guanina trifosfato
ANOVA: análisis de varianza	IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
Cat: cloramfenicol	Kbp: kilo pares de bases
CSF: factor de estimulación de la competencia	LB: Luria Bertani
CSP: péptido estimulador de la competencia	LFH-PCR: <i>PCR-synthesis of disruption cassettes with long flanking homology</i>
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenilindol	LTSEM: SEM a baja temperatura
DIC: Contraste Diferencial Interferencial	MCM: medio de competencia modificado
DNA: ácido desoxirribonucleico	mRNA: RNA mensajero
DNAC: DNA copia	MSgg: medio mínimo
dNTP: deoxinucleótidos trifosfato	SDS: dodecilsulfato sódico
DSM: <i>Difco Sporulation Medium</i>	SEM: microscopía electronica de barrido
dUTP: deoxiuridina trifosfato	Spc: espectinomicina
eDNA: DNA extracelular	ssDNA: DNA de cadena simple
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	TAE: tampón Tris, acetato, EDTA
EID: elevada intensidad de DAPI	Tet: tetraciclina
EPS: exopolisacáridos	TGH: transferencia génica horizontal
Erm: eritromicina	TY: medio de cultivo <i>tryptophane-yeast</i>
ESX: sistema de secreción Esat-6	T3SS: sistema de secreción tipo III
FM4.64: N-(3-triethylammoniopropil)-4-(6-(4-(diethylamino) fenil) hexatrienil) piridinio dibromuro	T4SS: Sistema de secreción tipo IV
GAPS: gamma amino propilsilano	Ufd: unidades formadoras de colonia
GFP: protein verde fluorescente	UM: unidades Miller

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

ON: toda la noche

ONPG: 0-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido

Opp: oligopéptido permeasa

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGA: pli- $\gamma$ -glutamato

QS: *quorum sensing*

RNA: ácido ribonucleico

RNAr: RNA retrotranscrito

RT: temperatura ambiente

***ABSTRACT***

---

***RESUMEN***

# ABSTRACT

Extracellular DNA production is a widespread feature present among many microorganisms. Particularly, the undomesticated strain *B. subtilis* 3610, has been shown to produce significant amounts of eDNA under very specific intracellular regulation and in response to quorum sensing signals at the end of the exponential phase. Previous work demonstrated that eDNA production and early competence share the same signaling pathway. That work led to the hypothesis that *comS*, a small gene exclusively described in relation to competence development, was the key factor regulating eDNA production. In this work, we demonstrate for the first time that *comS* is not only necessary for eDNA production, but it also regulates motility. Moreover, we studied the relationship between eDNA production, motility and competence and found out that motility is necessary for both eDNA production and competence development within the cell community. Finally, we studied the presence of eDNA in the multicellular structures created by *B. subtilis* communities and called aerial bodies or fruiting bodies, which are the living form they usually adopt in nature. Our results show that eDNA has not a structural role within aerial bodies formation. Moreover, we found a complex internal structure made up with micro-channels and filled with motile cells actively moving inside them. Overall, the results presented in this work describe new and interesting interactions related to cell differentiation processes, and contribute to the knowledge of the internal three-dimensional complex structure of the *Bacillus subtilis* multicellular communities.

# RESUMEN

El objeto de estudio de esta Tesis Doctoral fue la producción de DNA extracelular (eDNA) en la estirpe silvestre de *Bacillus subtilis* 3610. Con anterioridad en nuestro laboratorio se pudo demostrar que esta bacteria gram-positiva es capaz de producir elevadas cantidades de eDNA en respuesta a las señales de *quorum sensing* liberadas en fase exponencial tardía del crecimiento. Tras demostrar que la producción de eDNA y el desarrollo de la competencia temprana comparten la misma ruta de señalización celular, se planteó la hipótesis de que *comS*, un pequeño gen hasta ahora relacionado exclusivamente con el desarrollo de la competencia tardía, es el factor regulador responsable de la divergencia entre los fenómenos de competencia y producción de eDNA. En este trabajo hemos podido demostrar dicha hipótesis y describir por vez primera la regulación positiva que *comS* ejerce sobre los genes de motilidad. Al profundizar en el estudio de la relación existente entre los procesos de producción de eDNA, motilidad y competencia, nuestros resultados mostraron que la adquisición de motilidad en la población celular es necesaria tanto para la correcta producción de eDNA como para el desarrollo de la competencia. Finalmente, se investigó la producción de eDNA en el seno de las comunidades multicelulares producidas por *Bacillus subtilis* 3610. Nuestros resultados permiten descartar que el eDNA posea un papel estructural, a diferencia de lo que se ha descrito en otros microorganismos, al mismo tiempo que nos permitieron identificar por primera vez la presencia de una compleja estructura interna formada por micro-conductos. El estudio detallado de los mismos permitió comprobar la presencia de células con motilidad desplazándose en su interior. En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de investigación han permitido describir nuevas e interesantes interacciones implicadas en los procesos de diferenciación celular, así como profundizar en la compleja estructura interna tridimensional desarrollada por las comunidades multicelulares de *Bacillus subtilis*.



# INTRODUCCIÓN





## **1. Producción de DNA extracelular (eDNA)**

La producción de DNA extracelular (eDNA) es un fenómeno ampliamente distribuido en el medio ambiente. Ha sido descrito en bacterias, gram-positivas y gram-negativas, en arqueas y en hongos, y se ha detectado tanto en condiciones de laboratorio como en muestras de microorganismos de distintos ecosistemas terrestres y acuáticos (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017). Los mecanismos de liberación de las moléculas de eDNA descritos hasta la fecha incluyen transporte en vesículas, lisis celular o transporte activo como en el caso de la exportación a través del sistema de secreción tipo IV (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017). Cabe destacar que en la mayoría de los microorganismos donde se ha estudiado la producción de eDNA, se trata de un proceso coordinado por la población en respuesta a una determinada densidad celular y se induce en una subpoblación de células en respuesta a la acumulación de señales de *quorum sensing* (QS) (sistema de comunicación dependiente de densidad celular y que regula los comportamientos cooperativos) (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017).

Las funciones biológicas que desempeña el eDNA varían en relación a la especie estudiada. De este modo, el DNA se convierte en una molécula polivalente que actúa como componente estructural en la formación de comunidades multicelulares organizadas (biopelículas), como molécula señalizadora, como fuente de nutrientes o en la transferencia genética horizontal (TGH) (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017).

### **1.1 Producción de eDNA en bacterias**

Como se ha mencionado, numerosos organismos producen eDNA (Anexo I). A continuación se detallan aquellos en los que este proceso ha sido estudiado en profundidad.

#### **1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* es un patógeno oportunista gram-negativo capaz de liberar cantidades de hasta 18  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de DNA genómico de cadena doble en respuesta a señales de QS durante la fase exponencial tardía (D'Argenio *et al.*, 2002; Allensen-Holm *et al.*, 2006). El mecanismo de liberación del eDNA es mediante lisis celular a través de un mecanismo de fraticidio mediado por vesículas y por la inducción de profagos, ambos procesos regulados por las señales de QS (Kadurugamuwa & Beveridge, 1996; Allensen-Holm *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2008).

Además de ser detectado en cultivos planctónicos, el eDNA ha sido también detectado en las biopelículas de *P. aeruginosa* donde se obtuvo la primera evidencia de que el eDNA era necesario para su correcta formación (Whitchurch et al., 2002). Se ha observado que durante la formación de la biopelícula, el eDNA actúa como un compuesto de adherencia entre células estabilizando la estructura y proporcionando resistencia frente a agentes nocivos como por ejemplo al detergente dodecilsulfato sódico (SDS) (Klausen et al., 2003; Allesen-Holm et al., 2006; Jennings et al., 2015). La distribución del eDNA varía durante la maduración de las características biopelículas con forma de *seta* que desarrolla *P. aeruginosa*, desempeñando distintos papeles durante su formación. De este modo, en la fase inicial el eDNA se encuentra ampliamente distribuido por la superficie del sustrato facilitando el tráfico de células y su correcto alineamiento en el frente migratorio (Klausen et al., 2003; Allesen-Holm et al., 2006; Gloag et al., 2013). A continuación, una vez formado el “pie” de la *seta*, el eDNA interacciona con las células con motilidad que migran para situarse sobre el “pie” y formar la parte superior de la estructura (el “cap”) (Klausen et al., 2003; Allesen-Holm et al., 2006; Barken et al., 2008). Finalmente, cuando la biopelícula madura el eDNA se localiza en la base de la biopelícula formando láminas discretas concéntricas (Allesen-Holm et al., 2006).

#### 1.1.2 *Neisseria gonorrhoeae*

*N. gonorrhoeae* es una bacteria patógena gram-negativa capaz de liberar grandes cantidades de DNA cromosómico de cadena simple (ssDNA) al medio extracelular, durante la fase exponencial de crecimiento y mediante un sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado en una isla genética de 57 Kbp llamada Isla genética gonococal (GGI) (Dillard & Seifert, 2001; Hamilton et al., 2005). Los sistemas de secreción T4SS son sistemas conjugativos o efectores que translocan proteínas o complejos DNA-proteína. En este caso se trata del primer sistema T4SS descrito implicado en la exportación de DNA de una forma independiente de contacto celular (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Hamilton et al., 2005). *N. gonorrhoeae* posee competencia natural y se cree que el DNA liberado sirve para la TGH dado que esta bacteria puede ser transformada por el DNA liberado a través del T4SS con una eficiencia mayor que con el DNA liberado por lisis (Dillard & Seifert, 2001; Ramsey et al., 2011).

Se ha demostrado así mismo que el ssDNA es necesario en las fases tempranas de formación de la biopelícula de *N. gonorrhoeae* aunque, contrariamente a lo que ocurre en cultivo planctónico, el eDNA se libera de forma independiente al sistema de secreción T4SS puesto que mutantes en este

sistema forman biopelículas normales (Greiner *et al.*, 2005; Zweig *et al.*, 2014). Es por ello que se plantea que el origen del eDNA presente en la biopelícula proviene de un tipo de vesículas que se forman en la superficie celular en las biopelículas de bacterias gonococales, denominadas “blebs”, y que contienen DNA plasmídico o cromosómico (Dorward *et al.*, 1989; Greiner *et al.*, 2005).

### 1.1.3 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* es un patógeno gram-positivo en el que una subpoblación de células competentes (10-20%) provoca la liberación de DNA al medio extracelular a través de la lisis celular de las células no competentes mediante un mecanismo de fraticidio o predación activado por la acumulación extracelular de CSP (péptido estimulador de la competencia) (Steinmoen *et al.*, 2002; Eldholm *et al.*, 2009). Al alcanzar una determinada densidad poblacional, la acumulación de CSP activa la competencia temprana en un grupo de células. Éstas, además de sintetizar una inmunoproteína para no verse afectadas por la lisis, externalizan en sus membranas la proteína CbpD mediante la cual atacan a las células no inmunes (las no competentes) causando su lisis y la consecuente liberación de eDNA (Steinmoen *et al.*, 2002; Kausmally *et al.*, 2005; Eldholm *et al.*, 2009; Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017). Como en los casos anteriores, la producción de eDNA se puede considerar por tanto como un comportamiento social que depende de las señales de QS (Tomasz, 1966; Håvarstein *et al.*, 1995; Steinmoen *et al.*, 2002, 2003; Moscoso & Claverys, 2004; Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017).

Al igual que en el caso de *P. aeruginosa*, el eDNA también es un componente de la matriz extracelular en las biopelículas de *S. pneumoniae*. Actualmente se desconoce el mecanismo de liberación de eDNA en la biopelícula pero las evidencias apuntan a una liberación espontánea, tal vez por bacteriófagos (Moscoso *et al.*, 2006; Carolo *et al.*, 2010). Se ha observado también que el eDNA puede establecer interacciones con la proteína lítica LytC contribuyendo a la producción de una red de nucleoproteínas insolubles en la matriz extracelular que actuaría a modo de conector entre las células y entre las células y el sustrato (Domenech *et al.*, 2013).

### 1.2 Producción de eDNA en *B. subtilis*

*Bacillus subtilis* es una bacteria gram-positiva del suelo, no patógena, que ha sido aislada en un gran número de ambientes, en asociación con las raíces de ciertas plantas e incluso en el tracto gastrointestinal humano (Earl *et al.*, 2008; Gingichashvili *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Producción de eDNA en cultivos planctónicos

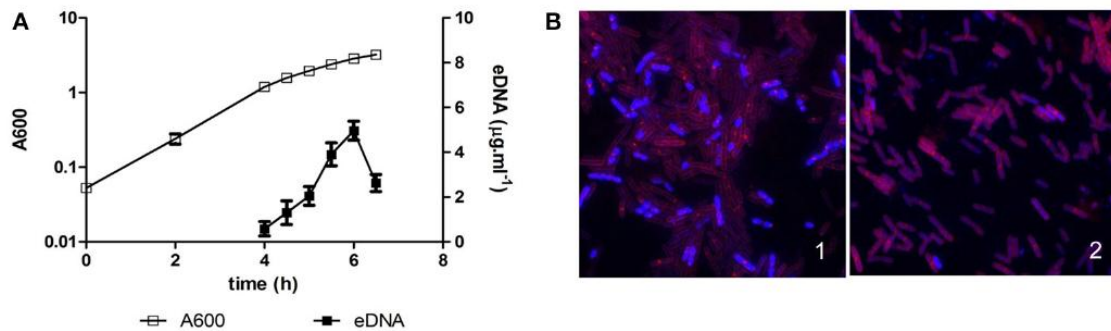
Los primeros trabajos en detectar producción de eDNA en *B. subtilis* describieron la presencia de una producción de  $0,1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de DNA en fase estacionaria, en cultivos de la estirpe de laboratorio *B. subtilis* 168 (Takahashi, 1962; Ephrati-Elizur, 1969, Crabb *et al.*, 1977; Lorentz *et al.*, 1991). En estos estudios se puso de manifiesto una posible relación entre la producción de eDNA y el desarrollo de la competencia. Un estudio posterior, realizado en la misma estirpe 168, detectó la liberación de fragmentos de DNA de 13 y 50 kbp en cultivos en medio LB y en fase exponencial temprana, correspondientes con genes de profagos (en particular PBSX), aunque a diferencia de los otros trabajos en este caso no se relacionó el DNA con la competencia (Shingaki *et al.*, 2003).

Estos estudios se realizaron en estirpes modificadas genéticamente adaptadas a las condiciones de cultivo de laboratorio y que se demostró que presentan diferencias importantes frente a la estirpe silvestre NCBI3610 o 3610, la cual no había sido expuesta a estas condiciones artificiales y que además es la estirpe parental de la que derivan gran parte de las estirpes de laboratorio que se emplean para estudiar *B. subtilis* (Burkholder & Giles, 1947; Kunst *et al.*, 1997). Se sabe que, en comparación con la estirpe silvestre 3610, las estirpes de laboratorio forman biopelículas frágiles y carecen de ciertos comportamientos sociales como el *swarming* (Branda *et al.*, 2001; Kearns & Losick, 2003). Por ello, los estudios realizados en nuestro laboratorio sobre la producción de eDNA se llevaron a cabo utilizando la estirpe silvestre 3610 (Zafra *et al.*, 2012),

De este modo, se demostró que *B. subtilis* 3610 es capaz de liberar al medio grandes cantidades de eDNA, con máximos de  $6 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  frente a los  $0,1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  descritos en la estirpe 168, durante la fase exponencial tardía, seguido de una drástica disminución en su concentración (fig.1) (Zafra *et al.*, 2012). Mediante un estudio empleando microarrays de oligonucleótidos de *B. subtilis*, se comprobó que el eDNA liberado se corresponde con el genoma completo y puesto que no se detectaron errores de secuencia, se consideró que probablemente se replique de forma similar al genoma (Zafra *et al.*, 2012). Además, al estudiar el mecanismo de liberación se descartó mediante distintos abordajes experimentales que fuera lisis celular, por lo que se propuso que el eDNA debía ser exportado mediante transporte activo (Zafra *et al.*, 2012).

La estirpe 3610, cuando crece en medio rico sólido, produce colonias apretadas y de pequeño tamaño. Se observó que en estas condiciones aparecen mutantes espontáneos con una morfología

de colonia extendida que se denominó “spread” y que no producen eDNA (fig.2). Asumiendo que la morfología extendida podía asociarse a la producción de eDNA se realizó una biblioteca de mutantes por transposición en busca de genes implicados en la producción de eDNA. Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de las inserciones que presentan una morfología extendida se encuentran en genes de competencia temprana y QS (*oppA*, *oppF*, *comX*, *comP*), en el gen que codifica para el factor de transcripción *degU*, regulador de diversos procesos de diferenciación celular; en genes de reparación y replicación del DNA (*mfd* y *topA*); y en el gen *yqhG* de función desconocida (Zafra *et al.*, 2012).



**Figura 1: Producción de eDNA en *B. subtilis*.** A) crecimiento de la estirpe 3610 en MSgg a 37°C en agitación. A600nm indica la absorbancia del cultivo y eDNA indica la concentración de eDNA en el sobrenadante ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); B) microscopia de fluorescencia de células de 3610 (1) y de un mutante defectivo en eDNA (2) tras 5:30h de cultivo. El eDNA está marcado en azul (DAPI) y las membranas en rojo (FM4.64). Extraído de Ibáñez de Aldecoa, et al. 2017.



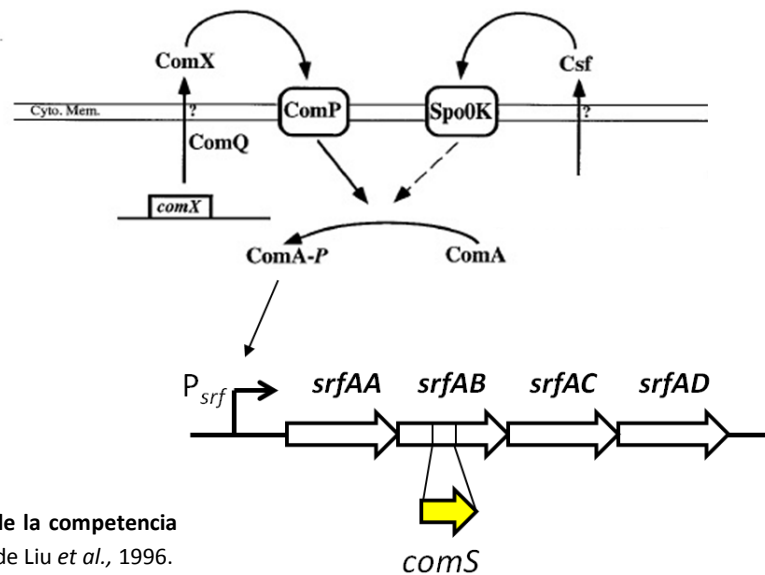
**Figura 2: Fenotipo del mutante espontáneo extendido.** A) Colonia de la estirpe silvestre 3610; B) colonia de un mutante extendido defectivo en la producción de eDNA, procedente de la misma estirpe crecida en medio rico LB.

En concreto los genes *oppA* y *oppF* codifican para componentes de la oligopermeasa Opp (Lazazzera, 2001; Solomon *et al.*, 2003), un transportador necesario para la activación la competencia temprana. Como se describirá en detalle más adelante cuando se trate el desarrollo de la competencia en las células de *B. subtilis*, tanto ComX (feromona) y ComP (proteína quinasa) como Opp están implicadas en el desarrollo de la competencia a través de la activación de ComA (Solomon *et al.*, 1995; Solomon & Grossman, 1996), regulador transcripcional que al fosforilarse induce la transcripción del operon de la surfactina (*srf*) y con ello al gen *comS* (fig.3), ubicado en el interior del operón *srf* y responsable de activar la competencia tardía a través de otro regulador transcripcional: ComK. Puesto que el desarrollo de la competencia se compone de dos fases (temprana y tardía), y dados los resultados obtenidos en la librería de transposición, se investigó la implicación de ambas fases en la producción de eDNA. De este modo se observó que los genes relacionados con competencia temprana (*comA* y *srfAA*) tienen afectada la producción de eDNA mientras que los mutantes en los genes de competencia tardía *comK*, *comEA* y *comGA*, los dos últimos relacionados con la maquinaria de importación de DNA, no tienen afectación de la producción de eDNA. Por lo tanto, se concluyó que en este punto de transición entre competencia temprana y tardía se produce una divergencia en la ruta de señalización entre la competencia natural y la producción de eDNA (Zafra *et al.*, 2012).

Evidencias indirectas apoyan un posible papel del gen *comS* en la liberación del eDNA. Mientras que una mutación en *srfAA*, el primer gen del operón de la surfactina (fig.3) (formado por los genes *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* y *srfAD*) afecta a la producción de eDNA, la producción de surfactina no se ve afectada en otros mutantes defectivos en la producción de eDNA, no relacionados con la competencia temprana, como en el caso del mutante *degU*. Por lo tanto, la transcripción de *comS*, localizado en *srfAB*, podría verse afectada por un efecto polar de la mutación de *srfAA*. De este modo *comS* podría estar involucrado en la divergencia entre las rutas de señalización de competencia y de producción de eDNA (Zafra *et al.*, 2012).

Al igual que ocurre con otros tipos celulares en el que tan sólo una parte de la población llega a diferenciarse en un subtipo celular concreto, el eDNA parece ser liberado exclusivamente por una subpoblación de células. Dado que se descartó la lisis celular como mecanismo de liberación, las células productoras de eDNA deben poseer elevados niveles de replicación del DNA. De hecho, mediante técnicas de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo se observó que entre el 10-15% de la población presentaba un incremento en la intensidad de la tinción de DNA intracelular en

la estirpe silvestre pero no en un mutante defectivo en la producción de eDNA, *degU*, en el momento previo al máximo de concentración de eDNA en el sobrenadante (Zafra *et al.*, 2012; Lampretch-Grandío, 2012).



**Figura 3: Activación de la competencia temprana.** Adaptado de Liu *et al.*, 1996.

El estudio de la expresión génica mediante microarrays de DNA, mostró que un mutante en el regulador transcripcional *degU* afectado en la producción de eDNA presentaba inhibición de genes relacionados con la motilidad (Lampretch-Grandío, 2012). Es por ello que también se investigó el efecto sobre la producción de eDNA de dos mutaciones en genes implicados en la formación del flagelo: i) *sigD*, el factor de transcripción esencial para el desarrollo de la motilidad (Wiggs *et al.*, 1981) y ii) *hag*, el gen que codifica para la síntesis de la proteína flagelina (DeLange *et al.*, 1976), también llamada Hag (abreviatura de H-antígeno), componente principal del filamento del flagelo. En ambos casos, las estirpes con mutaciones en estos genes eran defectivas en la producción de eDNA, por lo que se planteó la existencia de una relación, directa o indirecta, entre el desarrollo de ambos procesos.

Finalmente, se ha sugerido que la función del eDNA en *B. subtilis* estaría relacionada con la TGH. Las evidencias que sustentan dicha hipótesis son: i) la producción de eDNA y el desarrollo de la competencia están regulados por las mismas señales de QS; ii) ambos procesos se solapan en el tiempo durante el crecimiento en cultivo líquido, en fase exponencial tardía; y iii) el eDNA aislado del sobrenadante de cultivos de 3610 puede ser utilizado para transformar *B. subtilis*. De este modo,

competencia y producción de eDNA podrían haber evolucionado conjuntamente para asegurar el intercambio genético en las poblaciones de *B. subtilis* (Zafra *et al.*, 2012; Lampretch-Grandío, 2012).

### 1.2.2 eDNA en el contexto de las comunidades multicelulares de *B. subtilis*

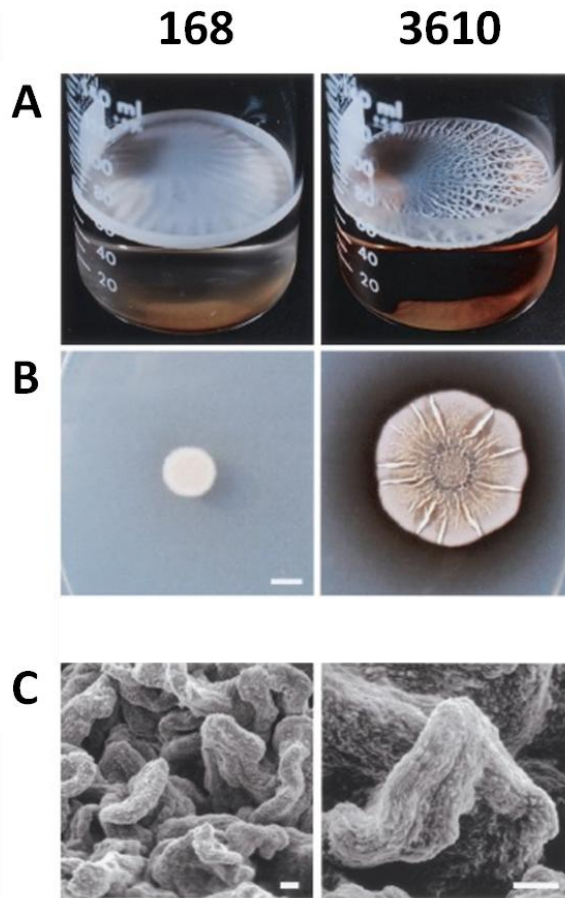
En su ambiente natural la mayoría de los microorganismos no viven como células individualizadas sino que se agrupan y organizan formando comunidades multicelulares embebidas en una matriz extracelular y denominadas biopelículas (Costerton *et al.*, 1999; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2013). En este tipo de comunidades las células adquieren protección frente a agentes químicos y físicos, frente a depredadores, y frente a condiciones ambientales adversas, además de favorecer el intercambio de información genética (Mah & O'Toole, 2000; Matz & Kjelleberg, 2005; Anderson & O'Toole, 2008).

#### 1.2.2.1 Formación de comunidades multicelulares o biopelículas por *B. subtilis*

La morfología de las biopelículas formadas por *B. subtilis* dependen de la estirpe. A diferencia de las estirpes de laboratorio, la estirpe silvestre 3610 produce biopelículas gruesas y estructuradas como resultado del crecimiento, diferenciación y agregación celular (Fig. 4A y B) (Branda *et al.*, 2001). Las colonias desarrollan una estructura tridimensional macroscópica caracterizada por la presencia de pliegues o “wrinkles”, y unas estructuras aéreas con forma de lengua y compuestas por largas cadenas de células cohesionadas y alineadas entre sí que se llamaron cuerpos aéreos y que sólo son visibles mediante microscopía (fig.4C) (Branda *et al.*, 2001).

La formación de la biopelícula en *B. subtilis* depende de factores ambientales e intrínsecos. Es el resultado de una serie de procesos físicos generados por la distribución y crecimiento de las células, junto con el efecto derivado de la diferenciación y migración celular. En general se compone de las siguientes fases: i) adhesión a la superficie, ii) maduración y iii) dispersión (O'Toole, 2001; Toyofuku *et al.*, 2016). Al inicio del cultivo, un gran número de células presentan motilidad. Conforme la densidad celular aumenta algunas de las células con motilidad se diferencian en células productoras de matriz extracelular, las cuales pierden la motilidad y no completan la separación después de la división celular, por lo que forman cadenas de células (Vlamakis *et al.*, 2013). La matriz extracelular de *B. subtilis* se compone principalmente de exopolisacáridos (EPS), exoproteasas y dos proteínas: TasA y BslA (Branda *et al.*, 2001; Kearns *et al.*, 2005; Branda *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2006; Vlamakis *et al.*, 2013; Arnouteli *et al.*, 2017).





**Figura 4: Comunidades multicelulares formadas por *B. subtilis*.** A) Biopelículas formadas por cultivos de las estirpes de laboratorio (168) y la estirpe silvestre 3610 en MSgg crecidos sin agitación; B) Colonias formadas por las mismas estirpes en MSgg sólido; C) Imágenes de microscopía de barrido electrónico de los cuerpos aéreos formados por la estirpe 3610. Extraído de Branda *et al.*, 2001.

La activación de la producción de matriz extracelular es un proceso regulado por Spo0A. Se trata de un factor de transcripción clave cuya actividad depende de su estado de fosforilación así como de su concentración intracelular. A bajas concentraciones Spo0A activa la producción de matriz extracelular a través del sistema SinI/SinR, mientras que a elevadas concentraciones activa la esporulación. En el trabajo de Fujita *et al.*, 2005, se plantea que Spo0A activa además la producción de los cuerpos aéreos de tal forma que esporulación y formación de los cuerpos aéreos son procesos co-regulados, fenómeno que cobra especial interés si se considera que las células que esporulan se encuentran localizadas en los ápices de los cuerpos aéreos (Branda *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2005). Fue precisamente tras descubrir la presencia de las células que esporulan en los ápices de los cuerpos aéreos que fueron descritos como cuerpos fructíferos dado que juegan el mismo papel que los cuerpos fructíferos de otros microorganismos productores de esporas como las Myxobacterias (Dworkin, 2000; Ward & Zusman, 2000).

Se ha descrito que las células productoras de matriz extracelular son las que posteriormente darán lugar a las células que esporulan (Vlamakis *et al.*, 2008). En general los distintos subtipos celulares presentes en la biopelícula poseen un patrón de distribución espaciotemporal característico. Mediante técnicas de microscopía de fluorescencia se ha podido demostrar que las células con motilidad, que son muy abundantes en la etapa inicial de la formación de la biopelícula, van migrando hacia la periferia y la base del mismo, mientras que su número se reduce conforme madura la colonia (Vlamakis *et al.*, 2008). Por otro lado, las células productoras de matriz extracelular son un grupo poblacional que se encuentra más ampliamente distribuido incluso solapando en algunas áreas con las células en esporulación. Finalmente las células que forman esporas se encuentran en los ápices de los cuerpos aéreos como comentamos anteriormente (Branda *et al.*, 2001).

Por último, la fase final de dispersión se produce mediante la dispersión por esporas y por células con motilidad cuando los recursos se vuelven insuficientes o las condiciones del entorno adversas (Vlamakis *et al.*, 2013).

#### 1.2.2.2 El eDNA no es necesario para la formación de comunidades multicelulares en *B. subtilis*

A diferencia de lo que ocurre en otros microorganismos, el eDNA no es necesario para la formación de las comunidades multicelulares de *B. subtilis*, dado que mutantes defectivos en la producción de eDNA forman las mismas biopelículas y cuerpos aéreos que la estirpe silvestre (Zafra *et al.*, 2012).

Actualmente no hay estudios que hayan investigado la localización del eDNA en las comunidades multicelulares de *B. subtilis*, a diferencia de lo ocurre con otros microorganismos. Además de en las especies detalladas en el primer apartado, se ha estudiado en *Enterococcus faecalis* (Barnes *et al.*, 2012), *Pseudomonas chlororaphis* (Wang *et al.*, 2016), varias especies de *Staphylococcus* como *S. epidermis* (Qin *et al.*, 2007) o *S. aureus* (Rice *et al.*, 2007), en *Helicobacter pylori* (Grande *et al.*, 2015), o *Campylobacter jejuni* (Svensson *et al.*, 2014).

Las principales funciones propuestas para el eDNA en las biopelículas son: i) componente estructural que provee estabilidad a la estructura (Moscoso & Claverys, 2004; Allesen-Holm *et al.*, 2006); ii) factor que promueve la formación de la biopelícula y la matriz extracelular (Qin *et al.*, 2007; Barken *et al.*, 2008); iii) inductor de procesos de TGH (Springael *et al.*, 2002; Molin & Tolker-Nielsen, 2003);

iv) dispersión de la colonia, como en el caso de *Caulobacter crescentus* (Berne *et al.*, 2010); y v) función protectora, reduciendo el transporte de agentes antimicrobianos a través de la matriz extracelular o interaccionando con otros compuestos de la matriz (Flemming & Wingender, 2010).

Conforme al patrón de producción de eDNA en cultivos planctónicos de *B. subtilis*, las células productoras de eDNA son un tipo de células diferenciadas que potencialmente pueden desempeñar un papel que aún está por esclarecerse en el desarrollo de los cuerpos aéreos de *B. subtilis*. Por lo tanto, pese a que se ha descartado que el eDNA actúe como molécula estructural sigue siendo de gran interés determinar su posible localización en el seno de la comunidad multicelular de *B. subtilis*.

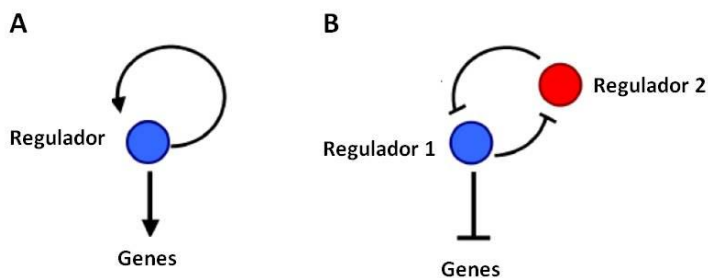
## **2. Otros tipos de diferenciación celular en *B. subtilis***

La diferenciación celular es un proceso que ha sido descrito en numerosas especies de microorganismos (van Gestel *et al.*, 2015). Es un fenómeno mediante el cual en una población genéticamente idéntica coexisten células con diferente expresión génica. Estas células se especializan para desarrollar diferentes funciones en el seno de la población, permitiendo la división celular del trabajo en la comunidad y la emergencia de nuevas propiedades de las que carecen las células por separado (Shapiro, 1998; López *et al.*, 2008; van Gestel *et al.*, 2015). Desarrollar una población heterogénea aporta numerosas ventajas. En primer lugar permite que la población posea una mayor capacidad de adaptación frente a los cambios que puedan producirse en su entorno. Además, mediante la división celular del trabajo se optimiza el uso de los recursos y el hecho de que coexistan diferentes vías metabólicas expresándose a la vez podría permitir a la población ahorrar costes en términos energéticos (López *et al.*, 2008).

Las células se diferencian en función de factores ambientales, estocásticos y por la acción de moléculas señalizadoras liberadas por otras células, proceso conocido como *Quorum sensing* (QS) (Oldewurtel *et al.*, 2015; van Gestel *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Estas moléculas señalizadoras han sido ampliamente estudiadas y son lactonas N-acetil homoserinas (AHLs) en el caso de gram-negativas, y péptidos en el caso de gram-positivas (Lazazzera & Grossman, 1998). Los procesos de diferenciación pueden producirse siguiendo una distribución gaussiana de la expresión génica, donde el “ruido” en la expresión génica genera fluctuaciones aleatorias en su expresión; o bien siguiendo una distribución claramente separada en dos subpoblaciones, conocido como fenómeno de biestabilidad. Este fenómeno puede ocurrir por dos mecanismos: i) por un mecanismo de

autorregulación, en cuyo caso es el producto del gen el que induce su propia síntesis (fig.5A), o bien ii) por la existencia de un bucle de represión: dos moléculas que se reprimen mutuamente (fig.5B) (Süel *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008; van Gestel *et al.*, 2015). Las rutas que desencadenan la diferenciación celular son vías metabólicas que de forma basal se encuentran inhibidas pero que en un determinado momento se activan gracias a que un regulador transcripcional específico alcanza la concentración umbral mínima necesaria para desencadenar el proceso.

*B. subtilis* posee la capacidad de diferenciarse en al menos siete tipos celulares sujetos todos ellos a una compleja regulación: células con motilidad, células productoras de surfactina, células competentes, células que producen eDNA, células productoras de matriz extracelular, células que esporulan y células que desarrollan el fenómeno de canibalismo (fig.6) (González-Pastor *et al.*, 2003; López *et al.*, 2009; Zafra *et al.*, 2012; van Gestel *et al.*, 2015).

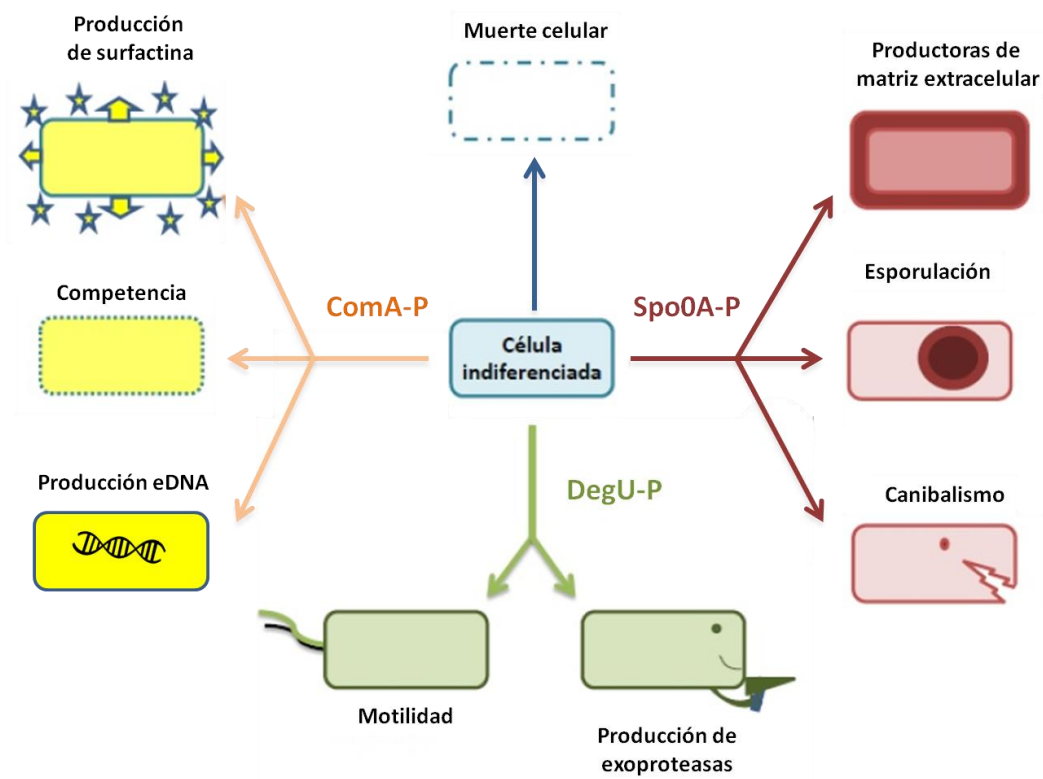


**Figura 5: Mecanismos de regulación de la diferenciación celular.** A) Autoregulación positiva; B) doble represión. Adaptado de López *et al.*, 2008.

En su mayoría se trata de fenómenos transitorios que se activan únicamente en una parte de la población, y en el que las células pasan por una fase de activación ON para posteriormente volver al estado OFF de inactivación (van Sinderen *et al.*, 1995; Chai *et al.*, 2008; Mukherjee & Kearns, 2014). Los procesos de diferenciación mencionados se distribuyen temporalmente reflejando distintas etapas a lo largo del crecimiento del microorganismo, y atendiendo a las variaciones en las necesidades nutricionales y en el tamaño poblacional (López *et al.*, 2008; Vlamakis *et al.*, 2013; Hollenbeck *et al.*, 2016; Mahtre *et al.*, 2016; Tasaki *et al.*, 2017). Es por ello que en cultivos planctónicos, la motilidad, la producción de la surfactina, el desarrollo de la competencia y la producción de DNA extracelular (eDNA) son procesos que tienen lugar durante la fase exponencial del crecimiento, alcanzando su máxima expresión en la población en fase exponencial tardía; mientras que la síntesis de matriz extracelular, la formación de esporas o el canibalismo son procesos

que discurren en fase estacionaria (Mirel *et al.*, 2000; González-Pastor *et al.*, 2003; Zafra *et al.*, 2012; Vlamakis *et al.*, 2013).

Las principales proteínas reguladoras de dichos procesos en *B. subtilis* son: ComA, Spo0A y DegU. Mientras que la proteína ComA regula la producción de surfactina (biosurfactante producido por *B. subtilis*), el desarrollo de la competencia (estado que permite a la célula captar DNA del medio extracelular) y la producción de eDNA; DegU regula el desarrollo de la motilidad y la producción de exoproteasas; y Spo0A activa los procesos de producción de matriz extracelular, esporulación y canibalismo (fig.6) (Chung *et al.*, 1994; Grossman, 1995; Hamoen *et al.*, 2000; González-Pastor *et al.*, 2003; Kobayashi, 2007; Verhamme *et al.*, 2007; Cairns *et al.*, 2014). A continuación se presentan con mayor detalle los procesos de diferenciación celular que se producen durante la fase exponencial.



**Figura 6: Representación de los distintos tipos de diferenciación celular en *B. subtilis*.** Los tipos celulares se han clasificado en grupos dependiendo del regulador transcripcional que regula su diferenciación y se han caricaturizado en función de su atributo más característico. Adaptado de Lampretch-Grandío, 2012.

## **2.1 Desarrollo de la motilidad**

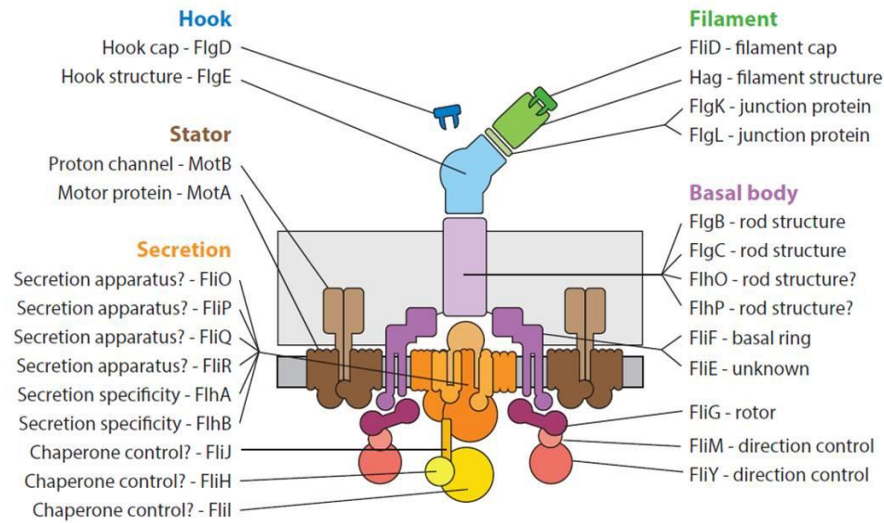
La motilidad es una adaptación adquirida por numerosas especies de microorganismos, que les confiere la capacidad de moverse por el entorno en respuesta a sus necesidades. De este modo, las células poseen sistemas que les permiten detectar las condiciones del entorno de tal forma que pueden moverse en busca de nuevos nutrientes, alejarse de sustancias tóxicas o depredadores o dispersar la población (Szurmant & Ordal, 2004). Para llevar a cabo el movimiento las células desarrollan estructuras llamadas flagelos, que se distribuyen de diversas formas por la membrana celular dependiendo de la especie (Ferris & Minamino, 2006; Mukherjee & Kearns, 2014).

### **2.1.1 Desarrollo del flagelo en *B. subtilis***

La motilidad en *B. subtilis* es un fenómeno que sólo una fracción de la población llega a desarrollar. Es un proceso de diferenciación biestable en el cual se desarrollan los estados ON y OFF de motilidad, de tal forma que mientras que una parte de la población se encuentra como células individuales con motilidad, la otra se encuentra formando cadenas sésiles (Mukherjee & Kearns, 2014). Este fenómeno se desarrolla durante la fase exponencial del crecimiento en cultivo líquido, alcanzando el máximo número de células con motilidad al final de la fase exponencial, tras lo cual el número descende conforme la población sigue creciendo. Las células motiles de *B. subtilis* se caracterizan por presentar flagelos repartidos de forma peritrica por toda la membrana celular, aunque con baja representación en los polos celulares (Guttenplan *et al.*, 2012; Mirel *et al.*, 1994; Mukherjee & Kearns, 2014).

La estructura flagelar se compone de 3 partes: i) el cuerpo basal, ubicado en la membrana celular y que actúa como lugar de anclaje del flagelo y de generación de la energía para la rotación; ii) el rotor, estructura flexible que sirve de punto de unión entre el cuerpo basal y el flagelo y que controla el ángulo de rotación; y iii) el filamento, estructura alargada que gira actuando a modo de propulsor (Fig.7) (Ferris & Minamino, 2006; Mukherjee & Kearns, 2014).

La formación del flagelo es un proceso secuencial en el que hasta no haberse formado completamente cada parte no se activa la síntesis de las proteínas que componen la siguiente. De este modo, el cuerpo basal es la primera estructura en formarse y posee un sistema de secreción tipo III (T3SS) que le permite exportar las proteínas que conformarán el rotor y el filamento (Abrusci *et al.*, 2013; Mukherjee & Kearns, 2014; Phillips *et al.*, 2015).



**Figura 7: Estructura del flagelo de *B. subtilis*.** A) Representación esquemática de la estructura del flagelo y de las proteínas que lo conforman. Adaptado de Mukherjee & Kearns, 2014.

La regulación del desarrollo de la motilidad es extremadamente compleja poniendo de manifiesto su relevancia en el desarrollo vital de las comunidades celulares de *B. subtilis*. Las proteínas necesarias para la formación del flagelo se hayan codificadas en el operon *fla/che*, el cual está formado por 32 genes (Fig.8). El operón *fla/che* posee 3 promotores,  $P_{D3}$  y  $P_{fla/che}$  localizados al inicio del operón y  $P_{ylxF3}$  localizado a la altura del gen *fliJ* (Barrilla *et al.*, 1994; Márquez-Magaña & Chamberlin, 1994; Ghelardi *et al.*, 2012).

La transcripción del operón *fla/che* es activada por el factor de transcripción  $\sigma^D$  que se une al promotor  $P_{fla/che}$ . El gen que codifica para  $\sigma^D$  se encuentra ubicado en la penúltima posición del operón *fla/che* por lo que al activar al operón activa su propia síntesis (Márquez-Magaña & Chamberlin, 1994). Además de unirse al promotor de *fla/che*,  $\sigma^D$  induce la transcripción de otros genes que también son necesarios para la formación del flagelo pero que se encuentran ubicados en distintos *loci* repartidos por el cromosoma. Entre estos genes se encuentra *hag*, el gen que codifica para la síntesis de flagelina, componente principal del filamento del flagelo (Mirel & Chamberlin, 1989). También se encuentran regulados por  $\sigma^D$  y localizados fuera del operón *fla/che*: i) los genes que codifican para las proteínas del cuerpo basal MotA y MotB, responsables de generar la fuerza protón-motriz necesaria para impulsar la rotación del flagelo (Blair & Berg, 1988; Kojima *et al.*, 2009),

y ii) los genes que codifican autolisinas, proteínas que favorecen la remodelación de la pared celular y la división celular permitiendo que las células con motilidad se mantengan libres en lugar de formar cadenas. Las autolisinas reguladas por  $\sigma^D$  son: LytA, B, C, D y F (Lazarevic *et al.*, 1992; Rashid *et al.*, 1995; Margot *et al.*, 1999; Smith, 2000; Chen *et al.*, 2008).

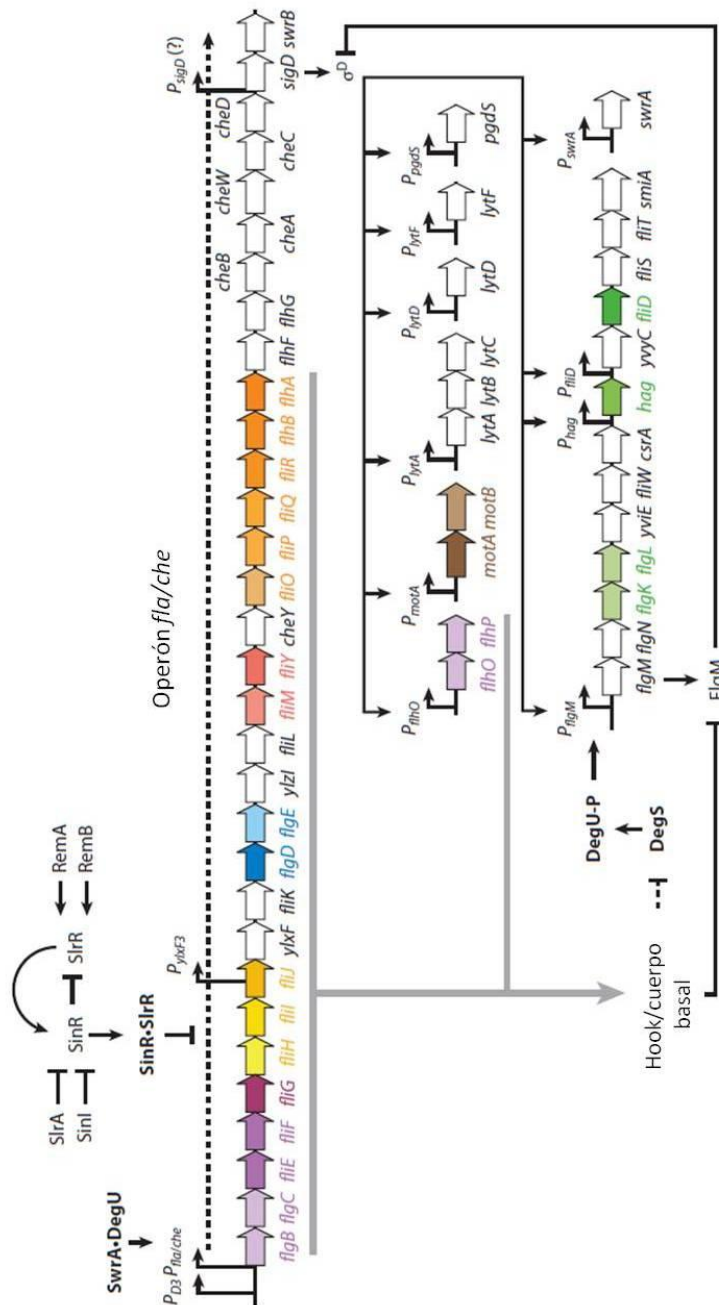
Otras proteínas que cabe destacar cuya síntesis depende de  $\sigma^D$  son (fig.8): el *anti-sigma factor* FlgM, que como su nombre indica, su función es inhibir la expresión de *sigD* y con ello la motilidad; y SwrA, proteína necesaria para el desarrollo del movimiento social tipo *swarming* (Kearns & Losick, 2003; Hamze *et al.*, 2011). Se ha descrito que SwrA activa la expresión del operón *fla/che* mediante la proteína reguladora DegU fosforilada (DegU~P) y actuando sobre  $P_{fla/che}$  (Caramori *et al.*, 1996; Amati *et al.*, 2004; Calvio *et al.*, 2008).

La proteína DegU es un regulador de la diferenciación celular implicado en numerosos procesos celulares, tales como la producción de matriz extracelular, la producción de exoproteasas, la competencia y la motilidad (Hamoen *et al.*, 2000; Kobayashi, 2007; Verhamme *et al.*, 2007). La manera en la que DegU es capaz de regular la motilidad atiende a diversos factores: influyen su grado de fosforilación, su concentración y su inter-relación con otros factores como SwrA (Kunst *et al.*, 1994; Verhamme *et al.*, 2007; Mordini *et al.*, 2013). Se ha descrito que a bajas concentraciones DegU~P activa la transcripción del operón *fla/che* mientras que a elevadas concentraciones lo inhibe (Kobayashi, 2007). De hecho, para activar la transcripción necesita también de la presencia de SwrA (Mordini *et al.*, 2013). Además de inhibir al propio operón *fla/che*, DegU~P tiene la capacidad de inducir la expresión de *swrA* y, en ausencia de SwrA, de inducir la expresión de FlgM inhibiendo así la actividad de  $\sigma^D$  (fig.8) (Hsueh *et al.*, 2011).

El factor DegU forma parte de un sistema biestable DegU/DegS (Kunst *et al.*, 1994) cuya regulación es compleja y depende, entre otros, del sistema SlrR/SinR/SinI (Ogura *et al.*, 2014). La proteína SinR es un regulador pleiotrópico expresado en todas las células de la población y requerido en diversos procesos celulares (Rashid *et al.*, 1996), entre ellos en la inhibición de los operones *epsA-O* y *tapA-sipW-tasA* responsables de la síntesis de exoproteasas y de matriz extracelular respectivamente (Kearns *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2006). Se ha descrito que SinR es capaz de anclarse al promotor de *degU* impidiendo que DegU~P pueda unirse y activar su propia expresión. Sin embargo, en presencia de SlrR (proteína homóloga a SinR que sólo se expresa en una subpoblación), se forma el complejo



SirR·SinR, el cual, además de permitir que DegU~P promueva la expresión de *degU* (Ogura *et al.*, 2014), inhibe la expresión del operón *fla/che* así como de los genes dependientes de  $\sigma^D$ : *hag*, *lytABC* y *lytF* (fig.4) (Cozy *et al.*, 2012).

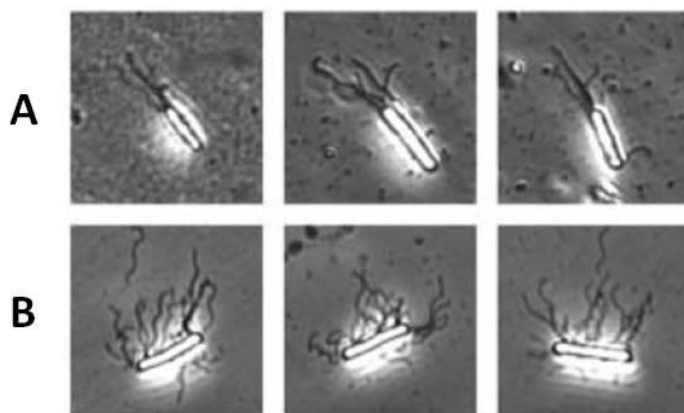


**Figura 8: Organización génica y regulación de los operones implicados en la formación del flagelo.** Las flechas en ángulo recto son promotores. Las flechas negras indican activación y las T inhibición. Adaptado de Mukherjee & Kearns, 2014.

Finalmente, la motilidad también se haya regulada por CodY. Esta proteína controla la regulación nutricional de diversos genes implicados en competencia, motilidad, metabolismo del nitrógeno y del acetato en respuesta a la tasa de crecimiento (Bergara *et al.*, 2003; Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). CodY también inhibe la expresión de *hag* y del propio operón *fla/che* a diversos niveles (Serror & Sonenshein, 1996).

### 2.1.2 Tipos de motilidad

En *B. subtilis* se han descrito tres tipos de movimiento: el *swimming*, el *swarming* y el *sliding*. Mientras que los dos primeros son movimientos dependientes de flagelo, el *sliding* es un tipo de movimiento que permite la expansión de las colonias en medio sólido como consecuencia del crecimiento celular y de forma independiente del flagelo (Fall *et al.*, 2006). El *swimming* es el movimiento utilizado por las células para desplazarse en medio líquido y en medio sólido con bajas concentraciones de agar (tradicionalmente 0,3% o menos). Se caracteriza porque es un movimiento individual, en el que las células de forma libre e independiente pueden desplazarse por el medio en respuesta a las señales del entorno (Ghelardi *et al.*, 2012). El *swarming* por el contrario es un movimiento de tipo social. Se trata de un movimiento coordinado en el que un grupo de células, denominadas *swarmers* (fig.9), se diferencian morfológicamente desarrollando un mayor número de flagelos (células hiperflageladas) y se desplazan conjuntamente alineándose entre sí y empujando al resto de células de la periferia de la colonia. Es un tipo de desplazamiento que se produce en medio sólido con agar al 0,7% (Kearns & Losick, 2003; Hamze *et al.*, 2011).



**Figura 9: Morfología de las células *swarmers*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los flagelos que presentan A) las células recogidas de un cultivo planctónico; B) las células *swarmers* tomadas del frente de migración de una colonia en cultivo sólido. Adaptado de Kearns & Losick 2003.

## 2.2 Desarrollo de la competencia

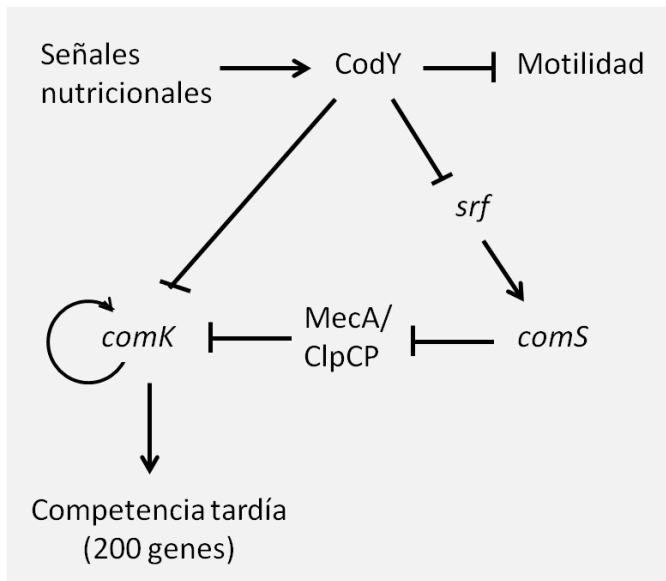
*B. subtilis* es competente natural, esto es, que tiene la capacidad de captar DNA del medio extracelular y recombinarlo con su DNA genómico en un proceso llamado transformación. El desarrollo de la competencia es, al igual que la motilidad, un proceso finamente regulado que sólo se produce en una subpoblación (representando el 10-20% de la población total) en respuesta a señales de QS y durante la fase exponencial tardía. Se trata de un proceso biestable en el cual las células que desarrollan la competencia se definen como en estado-K (*K-state*) (Dubnau, 1991; 1999; Avery, 2005).

Tradicionalmente se divide el proceso de desarrollo de la competencia en dos fases: la competencia temprana y la competencia tardía. La competencia temprana arranca cuando la población alcanza una determinada densidad, las células lo detectan y liberan al medio dos moléculas señalizadoras: la feromona ComX y el factor de competencia CSF (fig.3). ComX activa a la proteína ComP, la cual se autofosforila para a continuación ceder el grupo fosfato a la proteína citoplasmática ComA formando ComA~P. Al igual que ComX, CSF induce la fosforilación de ComA pero de forma indirecta: CSF atraviesa la membrana celular a través del oligopeptido permeasa Opp (Spo0K) y una vez en el citoplasma inhibe a RapA, kinasa que en condiciones normales desfosforila a ComA~P (fig.3) (Rudner *et al.*, 1991; Solomon *et al.*, 1996; Lazazzera, 1999;).

ComA es un regulador transcripcional que activa la transcripción del operón *srf*. El operón *srf* se compone de 4 genes: *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* y *srfAD*. En conjunto codifican para la maquinaria enzimática que sintetiza la surfactina, biosurfactante necesario para reducir la tensión superficial en los movimientos de *swarming* y *sliding*, que actúa como antibiótico y que incluso actúa como molécula señalizadora activando la esporulación (Vlamakis *et al.*, 2013). El papel del operón *srf* en la competencia viene a raíz de la presencia de un pequeño gen de 138 bp, llamado *comS* y localizado en el interior del gene *srfAB* pero fuera de su marco de lectura (fig.3). ComS desempeña una función crucial en el desarrollo de la competencia al inhibir la degradación del regulador transcripcional ComK (fig.10) (Nakano *et al.*, 1991; D'Souza *et al.*, 1994; 1995; Liu *et al.*, 1996; Core & Perego, 2003).

La competencia tardía comienza cuando la concentración de ComK alcanza un determinado umbral que desencadena la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de las proteínas que conforman el aparato de importación de DNA (fig.10). La actividad de ComK se encuentra inhibida de

formal basal por la acción conjunta de las proteínas MecA y ClpCP. Sin embargo, en presencia de ComS, MecA y ClpCP se unen con mayor afinidad a ComS liberando a ComK. En ese momento ComK tiene la capacidad de autoinducir su propia síntesis. Se ha descrito que la autoinducción de *comK* es el factor clave necesario para desencadenar la competencia, sin embargo, otros factores ayudan activamente, como es el caso de DegU, el cual se ha descrito que actúa como “cebador” (*primer*) potenciando la transcripción de *comK* (Ogura *et al.*, 1999; Persuh *et al.*, 1999; Turgay *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2002).



**Figura 10: Regulación de la competencia tardía e implicación de CodY.** Las T indican inhibición y las flechas inducción.

Como se ha mencionado anteriormente, los mecanismos regulatorios que permiten la diferenciación celular se hayan interconectados de tal forma que la activación de un determinado proceso afecta a la configuración general de la expresión génica de esa célula en ese determinado momento. Un ejemplo de ello es que el desarrollo de la competencia afecta negativamente a la motilidad. Concretamente, MecA induce la expresión de *sigD* mientras que ComK la inhibe indirectamente al inducir la expresión de *flgM* (Liu & Zuber, 1998).

Además de las señales de QS, el desarrollo de la competencia está sujeto a señales nutricionales puesto que la transcripción de *srf* y de *comK* está también regulada por CodY (fig.10). A bajas concentraciones de GTP, CodY se une a los promotores de *srf* y *comK* impidiendo así su transcripción (Serror & Sonenshein, 1996; Bergara *et al.*, 2003).

En conjunto, en este trabajo nos planteamos investigar la producción de eDNA en la estirpe silvestre 3610 a fin de esclarecer i) el papel que desempeña ComS en la activación del proceso, ii) la relación entre los procesos de motilidad y producción de eDNA, y iii) la localización del eDNA en el seno de las comunidades multicelulares.

# ***OBJETIVOS***

---

# OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron:

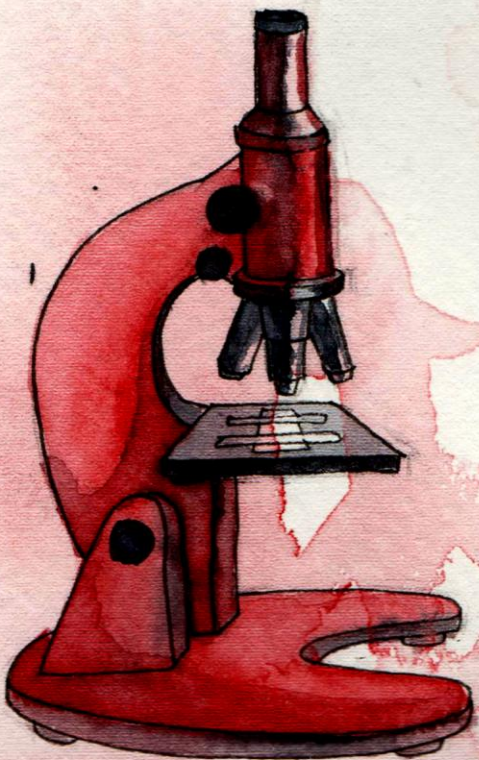
- I. Estudiar la función del gen *comS* en la producción de eDNA
- II. Estudiar la relación entre los procesos de diferenciación celular de motilidad y producción de eDNA
- III. Investigar la posible presencia y distribución del eDNA en los cuerpos aéreos formados por *B. subtilis*
  - a. Determinar mediante marcaje de fluorescencia la presencia de eDNA en los cuerpos aéreos
  - b. Investigar la distribución de las células con motilidad en base a su posible relación con la producción de eDNA



*MATERIALES*

*&*

*MÉTODOS*





## 1. MATERIALES

### 1.1. Estirpes bacterianas

Las estirpes de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se describen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Cepas de *B. subtilis* usadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
NCIB3610	silvestre	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center
PY79	<i>swrA srf</i>	P. Youngman
GP387	3610 <i>sigD::cat</i>	Colección de laboratorio
GP388	3610 <i>hag::erm</i>	Colección de laboratorio
DS1796	PY79 <i>motAB::tet</i>	Rösch TC <i>et al.</i> 2013
AL74	3610 <i>motAB::tet</i>	Este trabajo
DS209	PY79 $\Delta$ <i>swrA::tet</i>	P. Graumann
AL53	3610 $\Delta$ <i>swrA::tet</i>	Este trabajo
DS3819	3610 $\Delta$ <i>lytC::kan</i>	Chen R <i>et al.</i> 2009
DS108	3610 $\Delta$ <i>lytD::mls</i>	Chen R <i>et al.</i> 2009
DS1447	3610 $\Delta$ <i>lytF::tet</i>	Chen R <i>et al.</i> 2009
DS3822	3610 $\Delta$ <i>lytC::kan</i> $\Delta$ <i>lytD::erm</i> $\Delta$ <i>lytF::tet</i>	Chen R <i>et al.</i> 2009
DS877	PY79 <i>amyE::P<sub>spank</sub>-swrA (erm)</i>	P. Graumann
AL47	3610 <i>amyE::P<sub>spank</sub>-swrA (erm)</i>	Este trabajo
DL1031	3610 <i>amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ (cat)</i>	López D <i>et al.</i> 2009
GP240	3610 <i>comA::Tn917 (erm)</i>	Zafra O <i>et al.</i> 2012
AL171	3610 <i>amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ (cat)</i> <i>comA::Tn917-erm</i>	Este trabajo

AL172	3610 <i>amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ (cat) hag::erm</i>	Este trabajo
AL173	3610 <i>amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ (cat) ΔswrA::tet</i>	Este trabajo
GP233	3610 <i>oppA::mini-Tn10</i>	Zafra O <i>et al.</i> 2012
GP230	3610 <i>comP::mini-Tn10</i>	Zafra O <i>et al.</i> 2012
GP308	3610 <i>Δspo0K358::erm</i>	Zafra O <i>et al.</i> 2012
AL174	3610 <i>Δspo0K358::erm comP::mini-Tn10</i>	Este trabajo
OLGA336	3610 <i>P<sub>hag</sub>-gfp</i>	Colección de laboratorio
BAL209	3610 <i>ΔcomP::cat</i>	B. Lazzarera
AL167	3610 <i>P<sub>hag</sub>-gfp ΔcomP::cat</i>	Este trabajo
EG385	3610 <i>amyE::P<sub>feu</sub>-lacZ (spc)</i>	Zafra O <i>et al.</i> 2012
GP483	3610 <i>srfAC::Tn10</i>	D. Kearns
AL175	3610 <i>ΔcomS::spc</i>	Este trabajo
AL135	3610 <i>amyE::P<sub>srfA</sub>-comS (cat)</i>	Este trabajo
AL145	3610 <i>amyE::P<sub>srfA</sub>-comS (cat) srfAC::mini-Tn10</i>	Este trabajo
AL159	3610 <i>amyE::P<sub>spank</sub>-comS (spc)</i>	Este trabajo
AL176	3610 <i>amyE::P<sub>spank</sub>-comS (spc) sigD::cat</i>	Este trabajo
AL177	3610 <i>amyE::P<sub>spank</sub>-comS (spc) hag::erm</i>	Este trabajo
AL178	3610 <i>amyE::P<sub>spank</sub>-comS (spc) comA::Tn917-erm</i>	Este trabajo
EG243	3610 <i>yveQ::tet</i>	Colección de laboratorio

Tabla 2: Cepa de *E. coli* usada en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i>	Durfee T <i>et al.</i> 2008

---

$\Delta(ara\ leu)\ 7697\ galU\ galK\ rpsL\ nupG\ \lambda-$

---

### 1.2 Bacteriófagos utilizados en este trabajo

Tabla 3: Fagos utilizados en este trabajo.

Nombre	Genotipo	Actividad
SPP1	wt	Wild type

---

### 1.3 Plásmidos utilizados en este trabajo

Las características de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Plásmidos utilizados en este trabajo.

Vector	Marcador/Utilidad	Referencia
pDG1726	<i>Spc<sup>R</sup></i> . Derivado del plásmido pSB119. Se utiliza para construcción de mutantes por LFH-PCR.	Guérout-Fleury AM <i>et al.</i> 1995
pDG1662	<i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Spc<sup>R</sup></i> . Derivado del plásmido pDG268. Se utiliza para integrar el inserto clonado en el locus <i>amyE</i> de <i>B. subtilis</i> . Permite comprobación de doble <i>crossover</i> con <i>Erm</i> .	Guérout-Fleury AM <i>et al.</i> 1996
pMMN284	<i>Cat<sup>R</sup></i> . Plásmido que porta la secuencia del gen <i>comS</i> bajo el control de su promotor natural ( <i>P<sub>srf</sub></i> ).	Liu L <i>et al.</i> 1996
pDR110	<i>Spc<sup>R</sup></i> . Plásmido de integración en el locus <i>amyE</i> de <i>B. subtilis</i> que contiene el promotor inducible por IPTG <i>P<sub>spank</sub></i> .	Singh PK <i>et al.</i> 2013
pDG1662 <i>P<sub>srfA</sub></i> <sup>-</sup> <i>comS</i>	<i>Cat<sup>R</sup></i> . Derivado del plásmido pDG1662. Contiene la secuencia <i>P<sub>srfA</sub>-comS</i> .	Este trabajo
pDR110 <i>P<sub>spank</sub></i> <sup>-</sup> <i>comS</i>	<i>Spc<sup>R</sup></i> . Derivado del plásmido pDR110. Contiene la secuencia del gen <i>comS</i> de <i>B. subtilis</i> regulado por la expresión del promotor <i>P<sub>spank</sub></i> .	Este trabajo

---

### 1.4 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (tabla 5).

Tabla 5: Oligonucleótidos usados en este trabajo. Las secuencias marcadas en **negrita** hibridan con secuencias de genes de resistencia a antibióticos.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Secuencia P <sub>srf</sub> -comS	
PsrFAA.Dir	aacattttttcatttaaactgaa
comS.Rev	cttctccctccagcagaagt
Clonaje en pDR110	
Dir.comS.HindIII	gctcaagcttgaactggcactgtatttggag
Rev.comS.SphI	acatgcatgctgaattgcgttttcaagcc
Clonaje en pDG1662	
Rev.comS.EcoRI	gctcgaattcgtgaattgcgttttcaagcc
Knock-out comS	
P1 comS: Direct	aaggatgcgggtatgttcggcac
P2 comS: Reverse – Spc	<b>acatgtattcacgaacgaaaatcg</b> agctgtctcctcttgccttcggt
P3 comS: Direct - Spc	<b>atttagaaaacaataaaccttg</b> caaagaccggcttgaaaacgcaattc
P4 comS: Reverse	gaccgctccaaggaaagatcaaa

### 1.5 Medios de cultivo y antibióticos

Todos los medios de cultivo y soluciones fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave (J. P. Selecta) a 120°C y a 1 atmósfera de presión. Los antibióticos y las soluciones que no se pueden autoclavar, se esterilizaron por filtración en condiciones de esterilidad utilizando filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore).

El crecimiento de cepas de *B. subtilis* y *E. coli* en medio líquido rico se realizó en Luria-Bertani (LB) (1% Bacto tristona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis de la producción de eDNA al medio extracelular en *B. subtilis* se ha utilizado Medio Mínimo (MSgg): 5 mM tampón fosfato pH7, 0,1 M MOPS pH7, 5  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,7mM CaCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M tiamina, 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> fenilalanina, 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> triptófano, 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> treonina, 0,5% glicerol y 0,5% glutamato (Freese *et al.*, 1979).

Para la transformación de cepas de *B. subtilis* se ha utilizado Medio de Competencia Modificado (MCM) (100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7), 2% glucosa, 30 mM citrato trisódico, 200 mg.ml<sup>-1</sup> citrato férrico-amónico, 0,1% hidrolizado de caseína, 0,2% glutamato potásico) Spizizen, 1958. La concentración final de antibióticos utilizada es: 5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> cloramfenicol, 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> espectinomicina, 2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> kanamicina, 1  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> eritromicina 25  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> lincomicina (mls), 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> tetraciclina y 7  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> neomicina.

Se emplearon placas de medio sólido DSM (*Difco Sporulation Medium*) para estimar diferencias en la producción de surfactina de las distintas cepas de *B. subtilis* (Bactonutrient Difco, 10% KCl, 1,2% MgSO<sub>4</sub>, 1 M NaOH, 1 M Ca(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 0,01 M MnCl<sub>2</sub>, 1mM FeSO<sub>4</sub>, 1,5% de agar).

Para el crecimiento en medio sólido se utiliza medio LB suplementado con 1,5% Bacto agar. Antes del uso, las placas de LB se secan durante 16 horas a temperatura ambiente.

Para seleccionar recombinantes por actividad  $\beta$ -galactosidasa se añadió X-Gal (Duchefa) en la placa de selección, a una concentración final de 40  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Manipulación y condiciones de cultivos bacterianos

En medio líquido, las cepas de *B. subtilis* se cultivan a 30°C en agitador seco (Infos) durante al menos 12 horas y posteriormente se inoculan en nuevo medio y se incuban a 37°C en baño con agitación orbital a 200 rpm (New Brunswick Scientific, C76, Edison USA). Los cultivos en medio sólido se incuban en LB a 37°C en la estufa (Heraeus Kendro) durante al menos 12 horas. Para analizar la morfología de las colonias de las diferentes cepas, las bacterias son aisladas desde cultivo sólido con asa de platino en placa nueva en medio LB Agar (Conda). Los cultivos de biopelículas se incuban en MSgg sólido, durante 24 horas a 37°C.

Las fotografías de los experimento de morfologías, motilidad, producción de surfactina y test de amilasa, se tomaron utilizando una cámara Olympus DP70 y el programa DPController (Olympus Corporation).

Los datos se analizaron y representaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5, Inc.

### 2.1.1 Conservación de las cepas bacterianas

La conservación a corto plazo se hizo estriando el cultivo en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente, y a temperatura ambiente (RT) (máximo una semana). La conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos en 20% de glicerol (Merck) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.2 Condiciones de cultivo planctónico para la producción de eDNA en *B. subtilis*

En primer lugar se crece un cultivo en LB líquido durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm, hasta alcanzar una  $A_{600\text{nm}} \pm 1$  (medición realizada con un espectrofotómetro S2100 Diode Array, WPA Biowave). Transcurrido ese tiempo se transfiere el cultivo a MSgg diluyendo 1:1000 y 1:500 y se incuba a  $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm toda la noche (O.N.). Al día siguiente se inicia el cultivo a  $A_{600\text{nm}} = 0,05$  en medio MSgg líquido previamente atemperado, y se deja crecer a  $37^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm en baño con agitación orbital. A lo largo del cultivo se extraen muestras de 0,8 ml que se centrifugan 5 minutos a 5000 rpm (en una centrífuga Eppendorf modelo 5415D) para separar las células del sobrenadante. Finalmente se recoge 0,5 ml de sobrenadante al que se añade 1 ml de etanol puro (PanReac Applichem) y 50  $\mu\text{l}$  de acetato sódico (Sigma) 3 M pH5.2 para iniciar el proceso de precipitación del DNA dejando las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  O.N. (ver apartado 2.2.1.1).

Para inducir la expresión de las construcciones reguladas bajo el promotor  $P_{\text{spank}}$ , se añadió al medio a las 4 horas de cultivo 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG).

El crecimiento del cultivo se monitoriza extrayendo muestras a distintos tiempos y midiendo la  $A_{600\text{nm}}$  en el espectrofotómetro.

### 2.1.3 Transformación bacteriana

#### 2.1.3.1 Transformación de células no competentes, *E. coli*

Para inducir la competencia de *E. coli* se sigue el método de Inoue *et al.*, 1990. Para ello, se inoculan desde medio LB sólido células de *E. coli* en 100 ml de LB y se crecen a 37°C y 200 rpm de agitación hasta que el cultivo entre en fase exponencial (aproximadamente una  $A_{600nm} = 0,6$ ). A continuación se incuba en hielo durante 30 minutos, se centrifuga y se resuspende en 100 mM de cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) (Merck) previamente enfriado a 4°C. Se guardan las células a -80°C con glicerol 20%. Para la realización de transformaciones mediante tratamiento térmico de *E. coli* se sigue el método de Hanahan, 1983 con las siguientes modificaciones: 200  $\mu$ l de células competentes se incuban con 10-100 ng del DNA que se quiere transformar durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se transfiere a un termobloque (ThermoStat plus Eppendorf) a 42°C durante 1 minuto 30 segundos, y se colocan en hielo durante 2 minutos. A continuación se añaden 850  $\mu$ l de LB y se incuban durante 2 horas a 37°C y agitación 200 rpm. Se pone un control negativo sin añadir DNA a las células. Finalmente se extiende un volumen apropiado en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente.

### 2.1.3.2. Transformación de células competentes de *B. subtilis*

La cepa de laboratorio *B. subtilis* PY79 es competente natural, sin embargo la cepa natural 3610 se creía que no lo era pese a tener todos los genes de competencia. En nuestro laboratorio hemos conseguido transformarla de forma natural utilizando una variante del protocolo que usamos para PY79, salvo que la eficiencia que se obtiene es de dos órdenes de magnitud menor en la cepa natural con respecto a la de laboratorio (Zafra *et al.*, 2012).

Para la transformación de *B. subtilis* se incuba un preinóculo en medio LB líquido, O.N. a 30°C y 200 rpm. La elección de LB como medio de crecimiento para el preinóculo se debe al aumento de la eficiencia de competencia que hemos observado y que creemos que se debe a la presencia de extracto de levadura tal como describió Spizizen, 1958. Tras crecer toda la noche se transfiere a MCM sin lavado intermedio y se inicia el cultivo a  $A_{600nm} = 0,08-0,1$ . Se incuba a 37°C y 200 rpm en baño con agitación orbital hasta alcanzar el comienzo de la fase estacionaria ( $A_{600nm} = 1,5 - 2$ ), momento en el que a 1 ml de cultivo se le añaden 10  $\mu$ g de DNA genómico. El cultivo se incuba al menos 2 horas más a 37°C y 200 rpm. Se pone control negativo sin adición de DNA. Posteriormente se extienden diferentes volúmenes (100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l y 500  $\mu$ l) del cultivo en placas de medio LB sólido previamente preparadas con el antibiótico apropiado y se incuban O.N. a 37°C. A partir de las

colonias obtenidas se realizan dos reaislamientos consecutivos en el mismo medio, para garantizar que tenemos un cultivo puro.

### 2.1.4 Transducción en mutantes no competentes de *B. subtilis*

Para construir el mutante 3610  $\Delta spo0K::erm\ compP::mini-Tn10$  fue necesario utilizar el método de transducción por fagos dado que ambas mutaciones impiden el desarrollo de la competencia. Para la primera etapa del protocolo, a saber, la obtención de lisados de fagos portadores de la secuencia a insertar, preparar un cultivo de la estirpe de interés en 5 ml de medio de lisogenia *tryptophane-yeast* (TY líquido) pH7.2 (10 mg.ml<sup>-1</sup> triptona, 5 mg.ml<sup>-1</sup> extracto de levadura, 5 mg.ml<sup>-1</sup> NaCl, NaOH 1 M) e incubar 5 horas a 37°C en el baño con agitación a 200 rpm. Realizar diluciones seriadas 1:10 del fago SPP1 en tampón TY líquido y añadir 200 µl de cultivo a cada dilución. Incubar las preparaciones 15 minutos a 37°C en la estufa sin agitación. A continuación, añadir 3,5 ml de medio TY SOFT (medio TY con 0,28% de agar noble) atemperado a 45°C, mezclar y verter el contenido en placas de medio TY sólido (TY con 1,6% de agar noble) previamente preparadas. Dejar solidificar 30 minutos a RT e incubar O.N. a 37°C en la estufa.

Al día siguiente se realiza la transducción. Para ello seleccionar una placa, recoger el lisado en 3 ml de TY líquido asegurando la rotura mecánica de las células a fin de liberar los virus, y centrifugar 15 minutos a 5000 rpm. Tratar el sobrenadante con 100 unidades de enzima DNasa I (Roche) 30 minutos a RT y filtrar con filtros de 0,22 µm (Millex). A partir de esta solución de fagos, preparar diluciones seriadas 1:10 en medio TY líquido, y añadir 100 µl de cada dilución a una solución de 10 ml de TY líquido y 1 ml de cultivo de la estirpe a infectar, la cual ha sido previamente crecida en medio LB líquido a 37°C y 200 rpm durante 5-6 horas. Incubar la mezcla 30 minutos a 37°C en la estufa sin agitación. Finalmente concentrar las muestras, extender el preparado celular sobre placas de LB sólido previamente preparadas con el antibiótico correspondiente y con citrato sódico 10 mM, e incubar O.N. a 37°C en la estufa. Las colonias se reaislan dos veces consecutivamente en el mismo medio.

### 2.1.5 Pruebas de motilidad: *swimming* y *swarming*

Para analizar los dos tipos de motilidad estudiados, a saber, la motilidad dependiente de flagelo (*swimming*) y la motilidad dependiente de comportamiento social (*swarming*), nos basamos en el protocolo descrito por Kearns & Losick, 2003. En primer lugar se incubaba la estirpe de interés



estriando en LB sólido a 37°C O.N. Al día siguiente se inocula en LB con agar 0,3% para el *swimming* y 0,7% para el *swarming*, mediante picadura en el centro de la placa usando palillos previamente esterilizados. A continuación se incuban a 37°C en la estufa durante 15 o 24 horas y se fotografían los halos de crecimiento.

En todos los experimentos se incluyeron un control positivo (*B. subtilis* 3610) y un control negativo (3610 *hag::erm*). En cada experimento las picaduras se hicieron por duplicado y se realizaron 3 réplicas de cada experimento.

## 2.2 Técnicas de biología molecular

### 2.2.1 Aislamiento de ácidos nucleicos

#### 2.2.1.1 Cuantificación de la concentración de eDNA en cultivos planctónicos de *B. subtilis*

Se precipita el eDNA contenido en 0,5 ml de sobrenadante (ver apartado 2.1.2) con 50 µl de acetato sódico 3 M pH5.2 y 1 ml de etanol absoluto frío, O.N. a -20°C. Tras lavar la muestra con etanol 70%, se resuspende en 20 µl de agua libre de DNasas (Gibco) durante 1 hora a 65°C seguido de 1 hora a 4°C (Sambrook & Russel, 2001). La concentración del eDNA se determina mediante espectrofotometría (A260/A280). Para el análisis de la producción de eDNA de los diferentes mutantes estudiados, se han realizado al menos tres réplicas de cada experimento, utilizándose como control la estirpe silvestre 3610.

#### 2.2.1.2 Aislamiento y cuantificación de DNA cromosómico de *B. subtilis*

El aislamiento de DNA cromosómico se realiza usando el kit “Wizard® genomic DNA purification kit” (Promega). Previamente se rompe la pared celular resuspendiendo las células provenientes de 1 ml de cultivo en 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Gibco) y 1,2 µg.µl<sup>-1</sup> de lisozima (Sigma), posteriormente se utilizan los reactivos del kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se precipita con 2-propanol (PanReac), se lava con etanol 70% (Sambrook & Russel, 2001) y se resuspende en 100 µl de *Rehydration solution* (solución del kit) durante 1 hora a 65°C. La concentración se determinó mediante espectrofotometría como se ha descrito anteriormente.

#### 2.2.1.3 Aislamiento y cuantificación de DNA plasmídico de *E. coli*

El aislamiento de DNA plasmídico se realiza usando el protocolo “*Qiapreps® spin miniprep kit*” (Qiagen), partiendo de 3 ml de cultivo en LB y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este DNA se utilizó para reacciones de secuenciación, clonaje y mutagénesis mediante LFH-PCR (*PCR-synthesis of disruption cassettes with long flanking homology*). Para determinar la concentración de DNA plasmídico se usa un Nanodrop (Nanodrop® ND-1000).

#### 2.2.1.4 Aislamiento y cuantificación de RNA de *B. subtilis*

Se extraen 25 ml de cultivo (en los momentos previo y posterior al máximo de producción de eDNA) de estirpes de *B. subtilis* crecidas en MSgg. Se centrifuga el cultivo a 4°C y se aísla el RNA del sedimento celular por el procedimiento de extracción con fenol ácido caliente (Fawcett *et al.*, 2000). Cada muestra de RNA se analiza en gel de agarosa 0,8% (p/v) (Pronadisa) para garantizar la integridad de las bandas de 23S y 16S del RNAr y se mide su concentración mediante espectrofotometría.

#### 2.2.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (Roche). Generalmente, las reacciones contienen entre 3-10 µg de DNA, 0,1 volúmenes de la solución tampón suministrada por el fabricante y 0,01-10 unidades de enzima de restricción, en volúmenes finales de reacción entre 25-50 µl. Las digestiones de inserto se llevaron a cabo incubando entre 1-4 horas, los vectores se digieren al menos durante 12 horas; las temperaturas de incubación y de inactivación de las enzimas son las indicadas por el fabricante.

#### 2.2.3 Ligación de DNA

La ligación entre el vector linearizado y el inserto, obtenidos mediante digestiones en sitios compatibles, se incuban en proporción 1:5. Se utiliza 0,1 volúmenes de tampón de reacción para ligasa T4 y 1 unidad de DNA ligasa T4 (Roche) en un volumen final de 10 µl, siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla se incubaba a 16°C en termobloque durante al menos 12 horas.

#### 2.2.4 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

Las condiciones aplicadas a las reacciones de PCR son las siguientes: se utiliza 1 unidad de DNA polimerasa de *Termus aquaticus* (Taq) (Roche), 0,1 volúmenes de tampón 10X suministrado por la casa comercial, 4 mM de cloruro de magnesio (Cl<sub>2</sub>Mg), 0,125 mM de una mezcla igualada de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (Sigma) y 20 pmol de cada oligonucleótido, en un volumen final de 25 µl. La cantidad de DNA molde que se utiliza es de 20-70 ng. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel *et al.*, 1994, usando 4°C por debajo de la temperatura de desnaturalización de los cebadores para la fase de hibridación y se calcula un tiempo de síntesis de 1 minuto por cada 1 Kb. La fórmula usada para calcular la temperatura de desnaturalización de cada oligonucleótido es:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Donde  $T_m$  es la temperatura de desnaturalización y A, T, G y C hace referencia al número de bases nitrogenadas que tiene la secuencia del oligonucleótido de Adenina, Timina, Guanina y Citosina respectivamente.

### 2.2.5 Electroforesis de DNA y RNA

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó rutinariamente en geles de agarosa 0,8% (p/v) (Pronadisa), preparados en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) (Conda). Como patrón de peso molecular se utiliza el marcador Hyperladder I (Bioline). Para cada muestra a analizar se añade un décimo de tampón de carga 10X (TAE 10X, 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol).

Para la recuperación de fragmentos de DNA en los geles se utilizó kit “Qiaquick® gel extraction kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.2.6 Secuenciación de DNA

Las muestras de DNA se secuenciaron de forma automática mediante una variante del método de terminación por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) en la unidad de secuenciación del Centro de Astrobiología (Madrid).

Las secuencias se analizaron con el programa DNASTAR Lasergene. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa de edición de plásmidos ApE (M. Wayne Davis).

### 2.3 Análisis de actividades enzimáticas

#### 2.3.1 Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa

En primer lugar se realiza un cultivo planctónico para la producción de eDNA conforme a lo descrito en el apartado 2.1.2, pero tomando muestras adicionales de cultivo de 1 ml destinadas medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se centrifugan dichas muestras 5 minutos a 5000 rpm, tras lo cual se desecha el sobrenadante y se congela el precipitado celular a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se llevaron a cabo como describieron Harwood & Cutting, 1990. Para ello se descongelan los precipitados celulares y se resuspenden en 1 ml de buffer Z pH7 (40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 60 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 50 mM 2-mercaptoetanol). Se añaden 10  $\mu\text{l}$  de lisozima 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a diferentes tiempos incubando 15 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se inician con 200  $\mu\text{l}$  de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG) 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  preparado en tampón Z (Sigma) y se incuban a  $30^{\circ}\text{C}$  hasta que la muestra adopta un color amarillo, momento en el cual paramos la reacción con 500  $\mu\text{l}$  de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 M (Merck). Se determina la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a  $A_{420\text{nm}}$  (para medir la intensidad de amarillo) y  $A_{550\text{nm}}$  (para medir los restos celulares que pueden estar afectando a la absorbancia). Finalmente se calcula la actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades Miller (UM) conforme a la siguiente ecuación:

$$\text{UM} = \frac{A_{420} - 1,75 \times A_{550}}{(\text{tiempo min}) \times (\text{volumen ml}) \times (\text{factor de dilución}) \times (A_{600})} \times 1000$$

La actividad  $\beta$ -galactosidasa medida es intracelular y extracelular, y el porcentaje de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se refiere a la actividad total (intracelular más extracelular). El valor final de unidades de  $\beta$ -galactosidasa es el valor medio de tres réplicas independientes de el experimento.

### 2.4 Construcción de mutantes

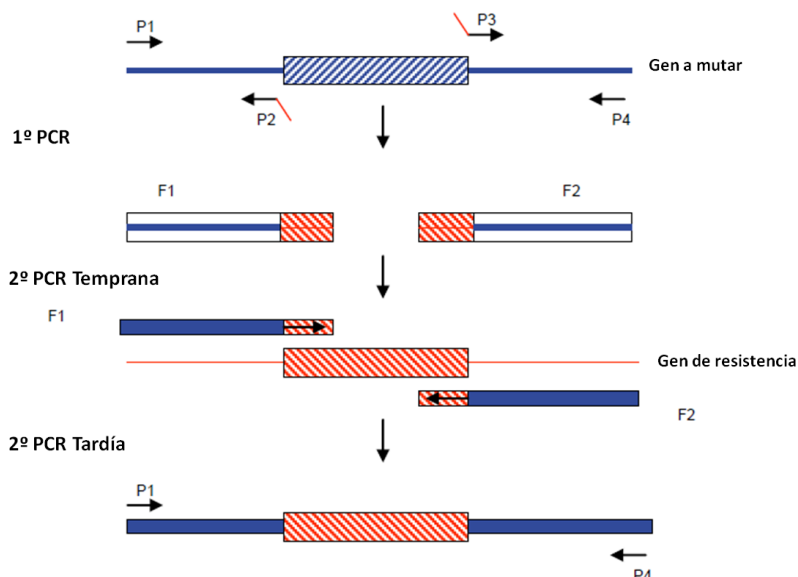
La delección del gen *comS* del genoma de *B. subtilis* 3610 se ha realizado mediante la técnica de “PCR-long-flanking homology polymerase chain reaction” (LFH-PCR) (Wach, 1996). Las delecciones/inserciones se construyen mediante la amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 1 Kb desde el extremo 5' del gen con los oligonucleótidos P1 y P2, y de otro fragmento de tamaño similar desde el extremo 3' amplificado usando los cebadores P3 y P4 (la

descripción de la secuencia de cada oligonucleótido se encuentra en la tabla 5). Los productos resultantes se purifican desde un gel de agarosa 0,8% y son usados como oligonucleótidos para amplificar el gen de resistencia a antibiótico elegido (Fig. 11).

Para este método se realizan tres rondas de PCR con las siguientes modificaciones:

Primera PCR: mismas condiciones que una PCR estándar pero se utiliza 1 unidad de polimerasa Pfu turbo® (Stratagene). El volumen final de la reacción es de 50 µl.

Segunda PCR temprana: se utiliza el kit “*Expand long template PCR system*” (Roche). Se utilizan 200 ng de DNA molde, 100 ng de cebadores, el tampón 3 suministrado por el fabricante, 0,125 mM de una mezcla igualada de dNTP y 1 unidad de DNA polimerasa *Expand* (Roche). El volumen final es de 50 µl.



**Figura 11: Esquema explicativo de la mutagénesis mediante técnica LFH-PCR.** Esquema adaptado de Wach, 1996.

Segunda PCR tardía: Se usan las mismas condiciones que en la anterior PCR, salvo que se usa 1 µl de la reacción anterior como molde, el tampón 2 del mismo kit de Roche y 0,4 µM de cada oligonucleótido.

El ciclo de PCR usado para la segunda PCR, tanto la temprana como la tardía, es el siguiente:

94°C 2 minutos  
10 ciclos: 94°C 30 segundos  
          63°C 30 segundos  
          68°C 8 minutos  
20 ciclos: 94°C 30 segundos  
          63°C 30 segundos  
          68°C 8 minutos + 20 segundos extra para cada uno de los ciclos  
68°C 10 minutos

Este procedimiento supone una delección completa del gen y sustitución por un gen de resistencia. El producto de PCR resultante se emplea para transformar inicialmente la cepa PY79 debido a su mayor eficiencia de transformación. Una vez comprobado que la mutación en *comS* se ha introducido correctamente en la estirpe PY79, se pasa a la estirpe 3610 por transformación mediante DNA cromosómico y se comprueba de nuevo por PCR. Los plásmidos que portan los genes de resistencia empleados están presentados en la tabla 4.

Otros mutantes analizados en este estudio han sido cedidos por otros laboratorios. Para introducir esas mutaciones en la estirpe que empleamos principalmente, *B. subtilis* 3610, se extrae previamente el DNA cromosómico y se emplea para transformar la estirpe de *B. subtilis* 3610 como se ha descrito anteriormente.

## **2.5 Microarrays de DNA**

Para la construcción del microarray de DNA, se utilizaron 4128 oligonucleótidos de 65 nucleótidos cada uno (SIGMA-Genosys), de los cuales 4106 se corresponden con genes presentes en *B. subtilis* y 22 son controles. Los oligonucleótidos se imprimieron en soportes de cristal Corning® UltraGAPSTM, recubiertos de gamma amino propilsilano (GAPS) (Britton *et al.*, 2002)

### **2.5.1 Preparación de DNAC marcado con fluorescencia**

Las sondas de DNAC se prepararon mediante la retrotranscripción del RNA total de cultivo de *B. subtilis* e incorporando directamente deoxiuridina trifosfato (dUTP) marcado con fluoróforos Cy3 o Cy5 al DNAC.

Para su marcaje, se incubó el RNA total (30 µg) con 1µg de hexámeros aleatorios a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente se realiza la retrotranscripción con las siguientes condiciones: 0,2

volúmenes de tampón suministrado por el fabricante, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM ditioneitol, deoxinucleósidos trifosfato (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 0,4 mM dTTP) y Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (GE Healthcare), se añade 1 unidad de Super Script II retrotranscriptasa inversa (Invitrogen), y la mezcla se incuba durante 2 horas a 42°C. La reacción se para incubando 15 minutos a 70°C. Se purifica la muestra usando el kit de purificación de productos de PCR, QiaQuick (Qiagen). Finalmente, las sondas se resuspenden en el tampón de hibridación (25 mM HEPES (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,8 µg de RNat de levadura, 3X SSC, 0,2% sulfato de sodio). La hibridación de los microchips de DNA se lleva a cabo mediante protocolo descrito por Eisen & Brown, 1999.

### 2.5.2 Análisis de los datos de microarrays de DNA

Se escanearon los microarrays usando Scanner GenePix 4100A (Axon Instrument, Inc.) y se procesaron las imágenes con el software Genepix Pro 6.0 (Axon Instruments, Inc). Los datos fueron analizados según describe Britton *et al.*, 2002, usando el programa de análisis estadístico AlmaZen (Bioalma). Para las comparaciones representadas con diagramas de Venn se utilizó el programa Venny 2.1.0 desarrollado por el Juan Carlos Oliveros (CNB-CSIC).

Para cada uno de los análisis realizados con microarrays se han utilizado tres réplicas y se incluyó un cambio de fluoróforo en una de ellas, para el análisis informático y estadístico.

## 2.6 Visualización de células planctónicas y colonias (biopelículas) mediante microscopía de fluorescencia, confocal y de barrido electrónico

### 2.6.1 Preparación de muestras y marcaje fluorescente

#### 2.6.1.1 Muestras de cultivo planctónico

En primer lugar se realiza un cultivo planctónico para la producción de eDNA conforme a lo descrito en el apartado 2.1.2, pero con los siguientes pasos modificados: se utiliza el precipitado celular generado a partir de las muestras de 800 µl de cultivo recolectadas para cuantificar la producción de eDNA (y de las cuales se recuperan 500 µl de sobrenadante), y se resuspende en los 300 µl de sobrenadante restante. A continuación se añaden 3 µl de 4',6'-diamidino-2-phenilindol (DAPI) 10 µg.ml<sup>-1</sup> (Molecular Probes, ThermoFisher), marcaje fluorescente que permea a través de la membrana celular uniéndose específicamente al DNA/RNA emitiendo fluorescencia en el rango azul del espectro ( $\lambda$  = 460 nm), y se incuba 1 minuto a RT y en oscuridad. Finalmente se lavan y

resuspenden las células en 10 µl de tampón fosfato salino (PBS) pH7.4 (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Para analizar las muestras al microscopio se aplica una gota de 5 µl de muestra en un portaobjetos de cristal para microscopía (ThermoScientific Menzel Gläser 76x26mm) y se tapa con cubres de cristal (Corning cover glass 1 ½ 22mm sq) previamente tratados con poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich), para inmovilizar las células.

### 2.6.1.2 Muestras de colonias (biopelículas)

Las bacterias se cultivan en medio MSgg sólido (10 ml en caso de placa petri estándar y 2ml en caso de placa P6), a 37°C durante 24 horas. A continuación se recorta un fragmento de agar en el que se encuentre la porción de la colonia a estudiar. En los ensayos realizados para detectar el eDNA en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* se realizó un marcaje de células “vivas y muertas” con el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit de ThermoFisher Scientific® y siguiendo las condiciones del fabricante.

En los experimentos de detección de las células con motilidad, la muestra se incubó con 100 µl de *N*-(3-Triethylammoniopropil)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenil) Hexatrienil) Piridinio Dibromuro (FM4.64) a concentración 5 µg.ml<sup>-1</sup> (Molecular Probes, ThermoFisher) y/o DAPI a 0,5 µg.ml<sup>-1</sup>, durante 3 horas a RT y en oscuridad. El FM4.64 es un marcador de membrana que emite en el rango rojo del espectro (λ = 640nm) al ser excitado.

### 2.6.2 Visualización de muestras y conteo de células con Microscopía de Fluorescencia

Las preparaciones se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B con lámpara de mercurio y cámara Orca Flash4.0 LT (Hamamatsu). Las muestras se observaron por Contraste de Fase y por Contraste Diferencial Interferencial (DIC), y las señales de fluorescencia mediante cubos de filtro adaptados para DAPI (excitación/emisión 358/461 nm), FM4.64 (515/640 nm) y proteína verde fluorescente (GFP) (488/510 nm). Las imágenes se capturaron utilizando el programa Leica Application Suite X (LASX) y se analizaron utilizando el programa Image J (Wayne Rasband, NIH, USA).

Para el conteo de células se seleccionaron un mínimo de 300 células por muestra. De este modo, para un determinado campo visual, primero se cuenta el número total de células y después el número de células que presentan una elevada intensidad de DAPI. Se definieron como células con



elevada intensidad de DAPI aquellas que presentan una intensidad de DAPI  $>74,000$  (siendo el promedio de alta intensidad de DAPI de  $80,855 \pm 6,531$ ). Considerando que el promedio de la intensidad de la fluorescencia DAPI en un mutante que no produce eDNA (3610 *oppA::mniTn10*, Zafra *et al.*, 2012) es de  $38,05 (\pm 3,046)$ , estamos considerando que las células con alta intensidad de DAPI son aquellas que tienen el doble de intensidad que el control negativo. Una vez cuantificadas las células se calculan los promedios y se representan gráficamente los porcentajes correspondientes a las células con elevada intensidad de DAPI frente al número total de células contabilizadas para cada muestra.

Para la observación de las muestras de colonias se utilizó específicamente el objetivo de 63X, que no es de inmersión y permite la observación de las muestras sin destruirlas.

### 2.6.3 Experimentos de Microscopía Confocal

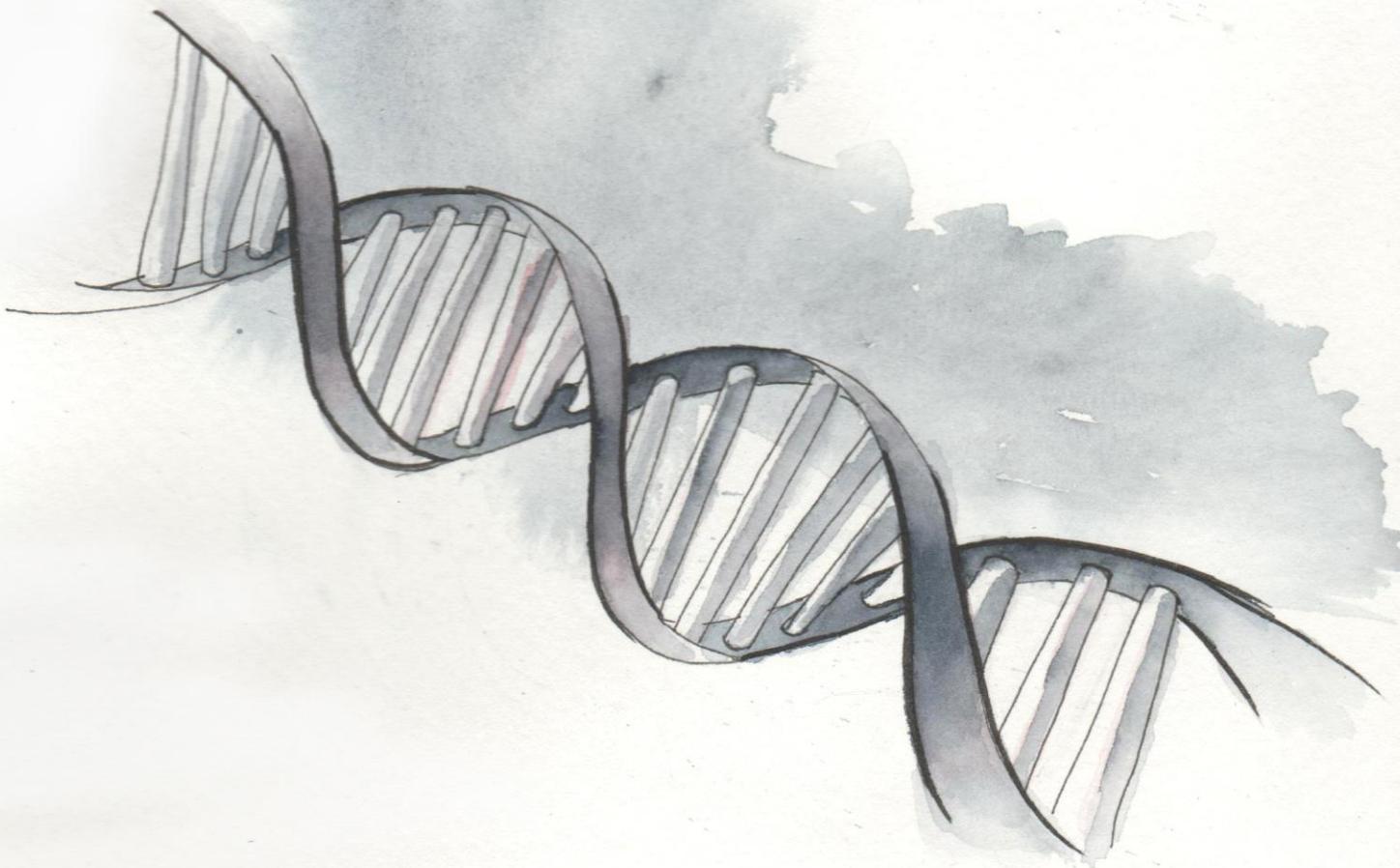
Las muestras de colonias se analizaron en el servicio de microscopía confocal del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 equipado con detectores y filtros para DAPI, FM4.64 y GFP. Las imágenes se tomaron utilizando un objetivo 20X sobre el que se aplicó el zoom.

Los vídeos de las células con motilidad con fluorescencia GFP se grabaron en el *Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology* (Marburg, Alemania), en el laboratorio del Prof. Dr. Knut Drescher especializado en el estudio de biopelículas bacterianas. Para la observación de muestras se utilizó un microscopio confocal específicamente modificado y adaptado para la visualización de biopelículas bacterianas, descrito en Vidakovic *et al.*, 2017.

### 2.6.4 Experimentos de Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura (LT-SEM)

La colonia se fija mecánicamente al portamuestras de un sistema de criotransferencia (Oxford CT1500), se sumerge en nitrógeno líquido subenfriado y se transfiere a la unidad de preparación del microscopio a través de un dispositivo de transferencia de bloqueo de aire. El espécimen congelado se criofractura y marca durante 2 minutos a  $-90^{\circ}\text{C}$ . Tras la sublimación del hielo, las superficies marcadas se recubren con partículas de oro pulverizadas tras lo cual se sitúa la muestra en la cámara del SEM. Las superficies fracturadas se observaron con un microscopio DSM960 Zeiss SEM a  $-135^{\circ}\text{C}$ .

# RESULTADOS



## CAPÍTULO 1: NUEVAS IMPLICACIONES DE COMS EN LA PRODUCCIÓN DE eDNA Y SU POSIBLE PAPEL EN OTROS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que la producción de eDNA en la estirpe salvaje de *B. subtilis* es dependiente de las señales de *quorum sensing* así como de la expresión de los genes relacionados con la competencia temprana (Zafra *et al.*, 2012), entre ellos del operón *srf*, que codifica un complejo multienzimático responsable de la producción de surfactina. Se demostró que un mutante en *srfAA*, el primer gen de este operón, es defectivo en la producción de eDNA mientras que otros mutantes que no producen eDNA sintetizan surfactina con normalidad. Esto llevó a plantear que no es la surfactina sino *comS*, gen localizado en el operón *srf* y hasta la fecha exclusivamente implicado en la activación de la competencia tardía, el punto de divergencia entre la ruta de señalización de la competencia y la producción de eDNA. Partiendo de esta hipótesis, nos propusimos estudiar la implicación del gen *comS* en la regulación de la producción de eDNA en la estirpe salvaje 3610 de *B. subtilis*.

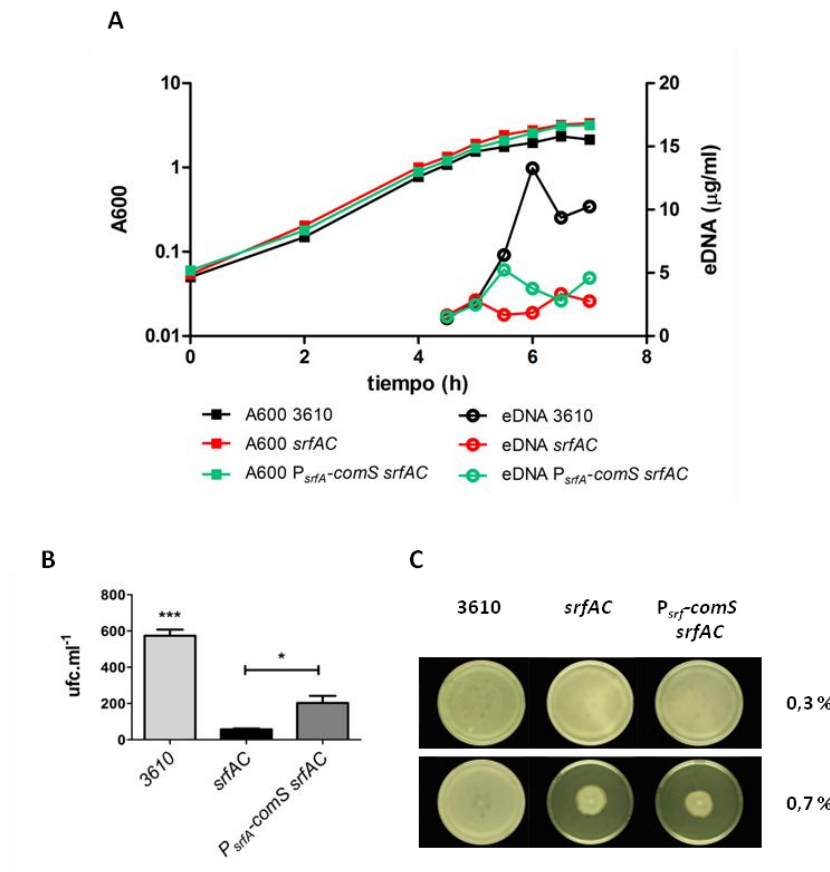
### 1. *ComS es necesario para la producción de eDNA*

#### 1.1 *La expresión de comS complementa parcialmente el defecto de producción de eDNA en un mutante srfAC*

El gen *comS* se localiza en el operón *srf*, concretamente dentro del gen *srfAB* aunque en otro marco de lectura. El operón *srf* consta de los genes *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* y *srfAD*, los cuales están bajo la regulación del promotor  $P_{srf}$ , cuya activación depende del factor de transcripción ComA. Mientras que los genes *srf* son necesarios para la síntesis de la surfactina, el producto de *comS* activa la competencia tardía a través de su regulación indirecta sobre ComK. Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que los genes implicados en el desarrollo de la competencia tardía (*comK*) y en la síntesis de la maquinaria de importación del DNA no están implicados en la producción de eDNA. Sin embargo, los mutantes *comA* y *srfAA* son defectivos en la producción de eDNA (Zafra *et al.*, 2012). Dadas las características del operón *srf*, la inhibición en la producción de eDNA observada en el mutante *srfAA* podría estar debiéndose a un efecto polar en el gen *srfAB* y por tanto en *comS*. A fin de comprobar este supuesto estudiamos el efecto sobre la producción de eDNA de una mutación

en el tercer gen del operón *srf*, *srfAC::mini-Tn10*, que afecta la producción de surfactina, pero que no debería tener un efecto polar sobre *srfAB* y *comS*.

Los resultados muestran que el mutante *srfAC* es defectivo en la producción de eDNA (fig.12A) al mismo tiempo que tiene significativamente disminuida su competencia (fig.12B). Estos datos reflejan que la correcta expresión del operón *srf* es necesaria para que se activen tanto la producción de eDNA como la competencia. Este mutante además, presenta motilidad tipo *swimming* semejante a la de la estirpe silvestre, mientras que tiene afectada la motilidad tipo *swarming* (fig.12C), lo cual es esperable dada la falta de surfactina.



**Figura 12: La producción de eDNA y la competencia en el mutante *srfAC* se complementa parcialmente con una copia de *comS* en el locus *amyE*.** Comparación de la producción de eDNA, la competencia y la motilidad entre cepas: 3610, 3610 *srfAC::mini-Tn10* y 3610 *amyE::P<sub>srfA</sub>-comS srfAC::mini-Tn10*. A) Cuantificación del eDNA en el sobrenadante. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración en el sobrenadante del cultivo (μg.ml<sup>-1</sup>). B) Capacidad de transformación medida en unidades formadoras de colonias (ufc.ml<sup>-1</sup>). Se realizó un análisis estadístico ANOVA (p<0,05, CI 95%) para determinar las diferencias significativas (asteriscos). C) Pruebas de motilidad tipo *swimming* y *swarming* en placas LB de 0,3 y 0,7 % agar respectivamente, inoculadas por picadura e incubadas 24h a 37°C.

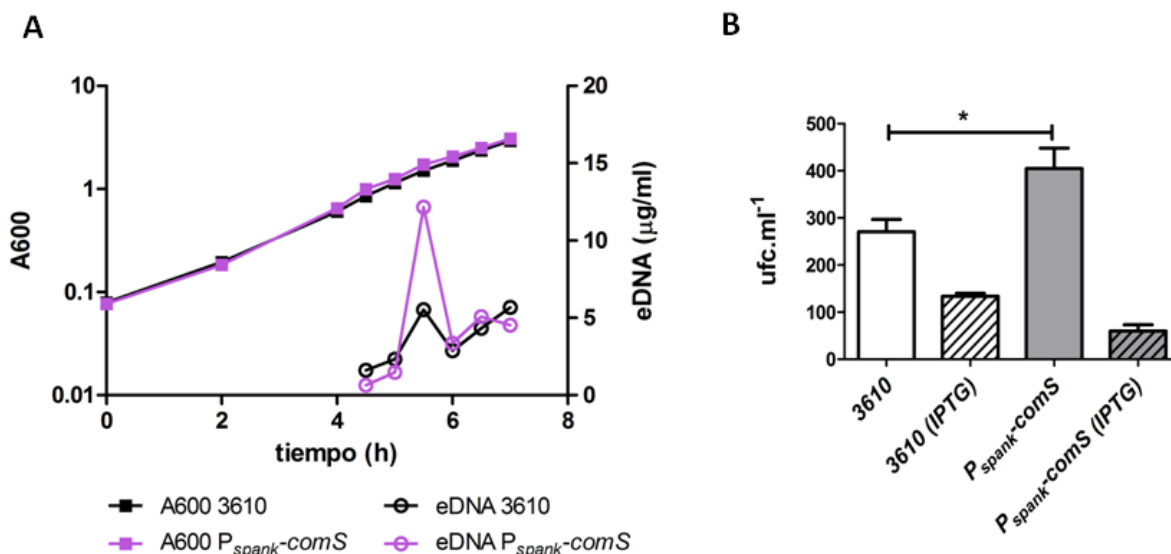
A continuación, se investigó si el defecto en la producción de eDNA y en la competencia de la mutación en *srfAC* podía ser complementada con la inserción de una copia del gen *comS* en el locus *amyE* bajo la regulación de su promotor natural  $P_{srf}$ . Los resultados reflejan una recuperación únicamente parcial de ambos procesos (fig.12A y B). Como era de esperar, la motilidad tipo *swarming* sin embargo no se recupera dado que el mutante no produce surfactina.

Estos resultados indican que, aunque la surfactina no esté implicada en la producción de eDNA, si lo está la correcta transcripción del operón completo. El hecho de que se produzca una recuperación parcial en la producción de eDNA y en la competencia, apoya la hipótesis de que el gen responsable de la regulación de la producción del eDNA es *comS* pero que su actividad depende de la correcta transcripción del operón completo.

### **1.2 La sobreexpresión de *comS* produce un incremento en la producción de eDNA**

Para analizar la función de *comS* en la producción de eDNA, se construyó una cepa con una copia extra de *comS*, bajo la regulación del promotor  $P_{spank}$ , introducida en el gen *amyE* bajo la regulación del promotor  $P_{spank}$  inducible por IPTG. En la fig. 13A se representa la curva de crecimiento y la cuantificación de eDNA en el sobrenadante del cultivo. Se puede observar como el mutante 3610 *amyE::P<sub>spank</sub>-comS* produce mayor cantidad de eDNA que el 3610. En la gráfica se han representado únicamente las muestras sin IPTG, ya que no hubo diferencias frente a los cultivos con IPTG.

Sabiendo que *comS* activa la competencia, se analizó la competencia de las cepas 3610 y 3610 *amyE::P<sub>spank</sub>-comS* en presencia y en ausencia de IPTG (fig.13B). En presencia de IPTG, la competencia se ve significativamente reducida en ambas estirpes de lo que deducimos que el IPTG tiene un efecto tóxico o inhibidor para la célula. Sin embargo, en ausencia de IPTG se observa como el mutante 3610 *amyE::P<sub>spank</sub>-comS* es significativamente más competente que la estirpe silvestre. Este resultado concuerda con el efecto observado en la producción de eDNA, de lo que deducimos que el promotor  $P_{spank}$  permite una expresión basal del gen *comS* en ausencia de IPTG. De este modo, estos resultados estarían indicando que pequeñas variaciones en la concentración intracelular de ComS son suficientes para afectar a la producción de eDNA y al desarrollo de la competencia.

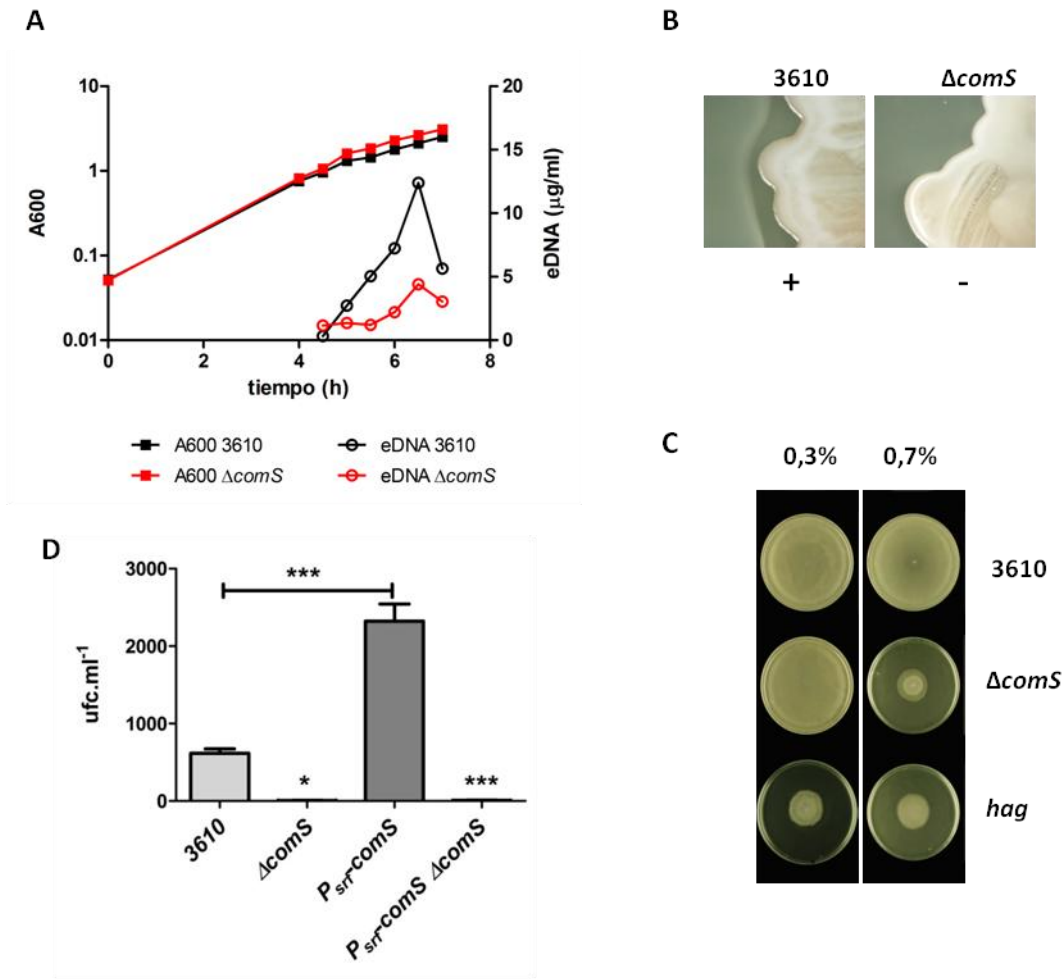


**Figura 13: La sobreexpresión de *comS* aumenta la producción de eDNA y la transformabilidad de *B. subtilis* 3610.** A) Cuantificación de la producción de eDNA en las cepas 3610 y 3610 *amyE::P<sub>spank-comS</sub>*. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación y sin IPTG (los cultivos que llevaban IPTG no se han representado porque no hubo diferencias entre añadir o no IPTG). Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración en el sobrenadante del cultivo (μg.ml<sup>-1</sup>). B) Análisis de la capacidad de transformación en presencia y ausencia de IPTG. Se realizó un análisis estadístico ANOVA ( $p < 0,05$ , CI 95%) para determinar las diferencias significativas (asteriscos).

### 1.3 Un mutante en *comS* tiene afectada la producción de eDNA

A continuación, se construyó un mutante *knock-out* en *comS*, el cual también tiene afectada la producción de surfactina como se muestra en la fig. 14B debido a la disrupción de *srfAB*. Como en los casos anteriores se analizó la producción de eDNA en MSgg del *knock-out* 3610  $\Delta comS::spc$  en comparación con la estirpe silvestre. Como se puede observar en la fig. 14A, el mutante  $\Delta comS$  tiene afectada la producción de eDNA. Así mismo, al igual que ocurre con *srfAC*, presenta motilidad tipo *swimming* pero no *swarming*, resultado esperable ya que no produce surfactina (Fig.14C). Por lo tanto, los resultados confirman que *comS* está implicado en la producción de eDNA.

El siguiente paso consistió en complementar la mutación en  $\Delta comS$  introduciendo una copia del gen *comS* en el locus *amyE* bajo el promotor natural de la surfactina *P<sub>srf</sub>*. Sin embargo no se consiguió restaurar la producción de eDNA (datos no mostrados) ni tampoco la competencia (fig.14D).



**Figura 14: Implicación de *comS* en la producción de eDNA.** A) Cuantificación de la producción de eDNA de las cepas (o estirpes) 3610 y 3610  $\Delta comS::spc$ . Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración en el sobrenadante del cultivo ( $\mu g \cdot ml^{-1}$ ). B) Test de producción de surfactina en placas de DSM sólido. C) Pruebas de motilidad de tipo *swimming* y *swarming* en placas de LB con 0,3 y 0,7 % agar respectivamente, inoculadas por picadura e incubadas 24h a 37°C. Se utilizó el mutante 3610 *hag::erm* como control negativo. D) Análisis de la capacidad de transformación de los mutantes 3610  $\Delta comS::spc$ , 3610 *amyE::P<sub>srf-comS</sub>* y 3610 *amyE::P<sub>srf-comS</sub> ΔcomS::spc*. Se realizó un análisis estadístico ANOVA ( $p < 0,05$ , CI 95%) para determinar las diferencias significativas (asteriscos).

## 2. Perfil transcripcional del mutante $\Delta comS$

Se estudió la comparación de la expresión génica del mutante 3610  $\Delta comS::spc$  con la de la estirpe silvestre en distintos momentos del crecimiento del cultivo durante la fase exponencial. Para ello se utilizaron *microarrays* de olinucleótidos basados en la secuencia de *B. subtilis* 168 (Britton *et al.*, 2002). Las estirpes se cultivaron en medio MSgg líquido y se tomaron muestras para aislamiento de

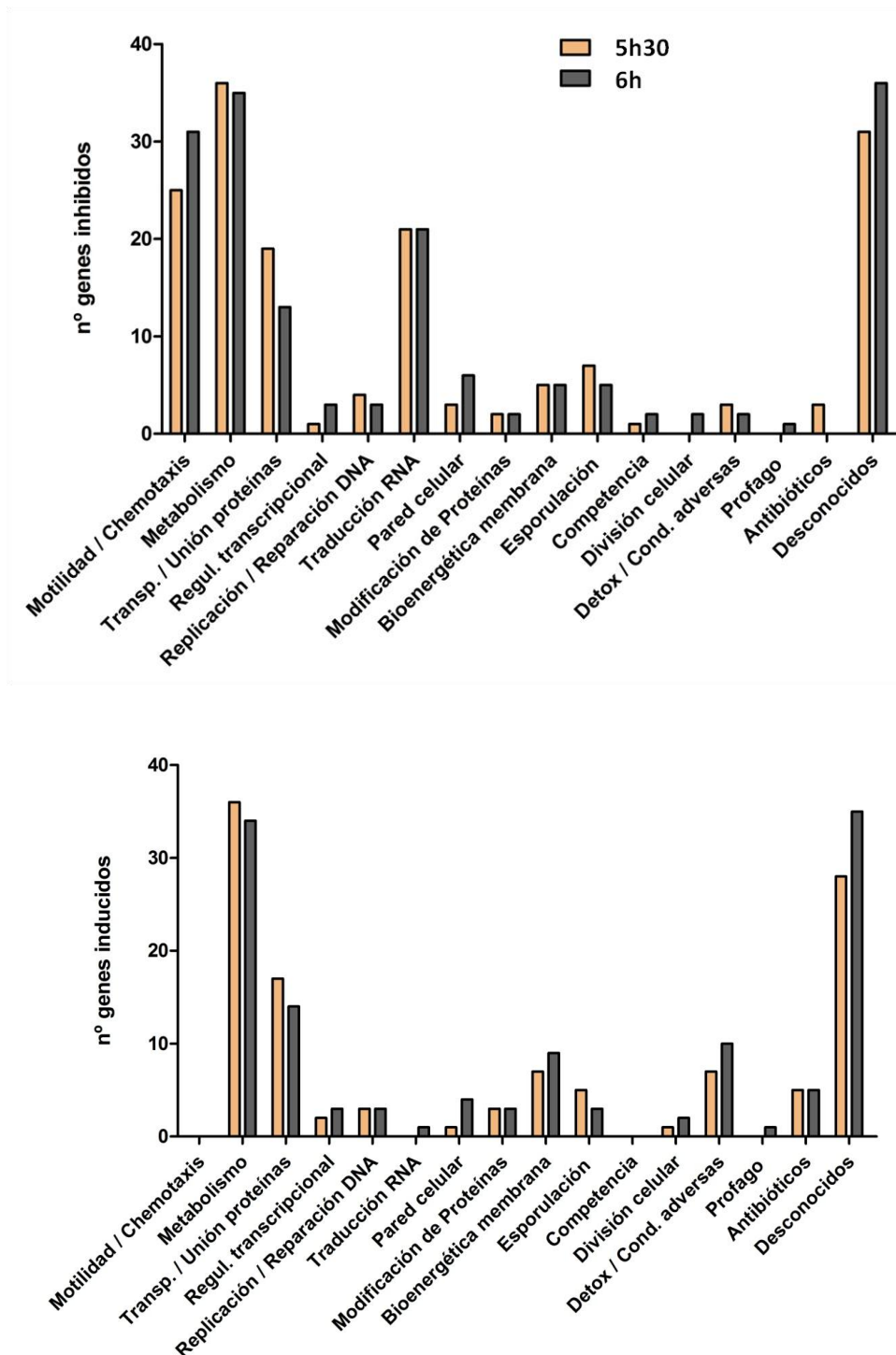
RNA en dos momentos diferentes del cultivo. La primera muestra se tomó a las 5:30 h de crecimiento, momento previo al máximo de concentración de eDNA en el sobrenadante que tiene lugar a las 6 h y en el que se recogió la segunda muestra. Se aplicó un análisis estadístico a los datos obtenidos de tres réplicas, tras lo cual se seleccionaron los genes que presentaran un ratio (*Fold change*) > 1,8 y un *p-value* menor o igual a 0,8. De forma global, el número de genes afectados por la delección del gen *comS* es muy elevado, lo cual podría estar indicando que *comS* desempeña una función reguladora importante en la célula (el listado con los genes que resultan del análisis se presenta en el Anexo II).

### **2.1 Genes Inhibidos en el mutante $\Delta comS$**

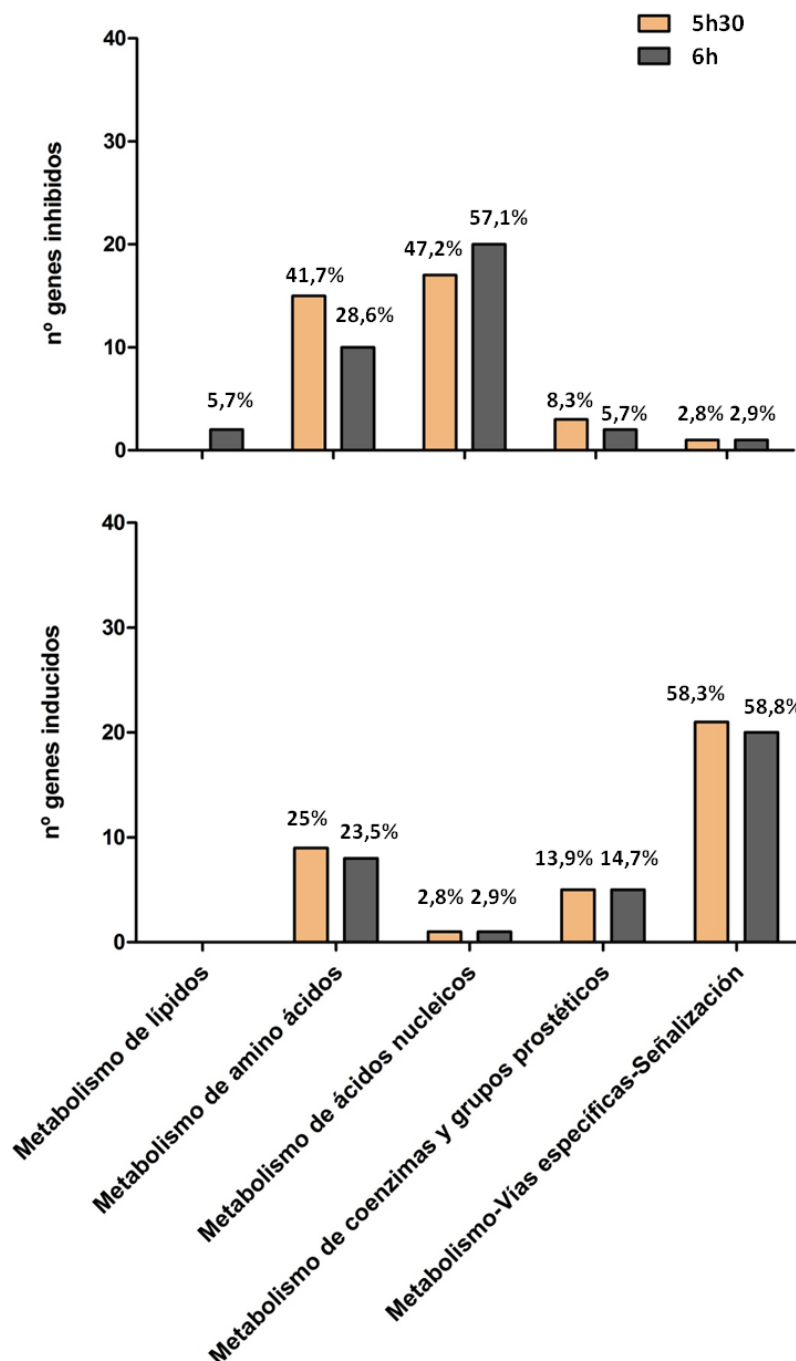
Se detectaron un total de 161 genes inhibidos con respecto a la estirpe silvestre a las 5:30 h del inicio del cultivo, y de 167 a las 6 h. En la fig. 15A se representan agrupados por funciones biológicas, donde se puede apreciar que el patrón de expresión en ambos momentos del crecimiento del cultivo es muy similar.

Sorprendentemente, un 15,5 % de los genes inhibidos están implicados en motilidad y quimiotaxis, porcentaje que se incrementa a 18,6 % a las 6 h. Aunque la mayoría de los genes pertenecen al operón *fla/che*, cabe destacar la inhibición de los genes *sigD* (regulador principal de la motilidad), *hag* (síntesis de flagelina) y *motA* (motor para la rotación del flagelo), relacionados con la producción de eDNA como se describe en el capítulo 2 de este trabajo; o los genes *lytD* y *lytA* que, aunque su función está relacionada con la remodelación de la pared celular, su expresión depende de *sigD* y por tanto de la motilidad. Por lo tanto, este resultado muestra por primera vez que la expresión del gen *comS* induce, de forma directa o indirecta, la expresión de los genes de motilidad y quimiotaxis. Es importante resaltar que la inhibición de estos genes no es total, se trata de una inhibición con respecto a la estirpe silvestre pero el mutante sigue presentando expresión de dichos genes puesto que se detecta señal de hibridación en todos ellos por encima de los niveles de fondo. Por lo tanto, estos resultados no son contradictorios con el hecho de que el mutante  $\Delta comS$  tenga motilidad tipo *swimming* como se muestra en la fig.14C. Además, es importante destacar que las técnicas experimentales utilizadas entre ambos experimentos son diferentes ya que tanto los medios de cultivo utilizados como los tiempos de incubación varían, lo que podría explicar que se observen diferencias.





**Figura 15: Asignación funcional de los genes que se expresan diferencialmente en el mutante  $\Delta comS$  en relación a la estirpe silvestre.** Genes inhibidos (A) e inducidos (B) en el mutante 3610  $\Delta comS::spc$  a las 5:30 h y 6 horas del inicio del cultivo (MSgg a 37°C con agitación). Los perfiles transcripcionales de las células extraídas a las 5:30 h y a las 6 h (a las 6 h se observa la máxima concentración de eDNA en el medio) se compararon mediante la técnica de *microarrays* de DNA.



**Figura 16: Genes relacionados con el metabolismo que presentan expresión diferencial en el mutante  $\Delta comS::spc$  en relación a la estirpe silvestre.** Representación según la función biológica de los genes inhibidos (A) e inducidos (B) en el mutante 3610  $\Delta comS::spc$  a las 5:30 h y 6 h de cultivo. Los porcentajes indicados en las barras corresponden al porcentaje en relación al total de genes de metabolismo para cada muestra (5:30 h y 6 h). Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Los perfiles transcripcionales de las células extraídas a las 5:30 h y a las 6 h (a las 6 h se observa la máxima concentración de eDNA en el medio) se compararon mediante la técnica de *microarrays* de DNA.

Por otro lado, los genes relacionados con el metabolismo suponen el 22,4 % del total de genes inhibidos a las 5:30 h y el 21 % a las 6 h. El grupo “metabolismo” en realidad engloba genes relacionados con las siguientes funciones biológicas (conforme a la clasificación de la base de datos *SubtiList*): metabolismo de lípidos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos y metabolismo de vías específicas y señalización. Curiosamente, la mayoría de los genes inhibidos están implicados en el metabolismo de ácidos nucleicos y de aminoácidos (fig.16A). A las 5:30 h representan el 41,7% y el 47,2 % del total de genes del metabolismo respectivamente. A las 6 h sin embargo, incrementa el número de genes inhibidos relacionados con el metabolismo de los ácidos nucleicos (57,1 %) y se reduce el número de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos (28,6 %). Estos resultados son de especial interés si consideramos que los tiempos de crecimiento del cultivo estudiados se corresponden con los de la síntesis y liberación al medio extracelular del eDNA. En este sentido, es destacable también la inhibición de determinados genes relacionados con la replicación del DNA en el mutante  $\Delta comS$ . En concreto, aparecen inhibidos la subunidad alfa de la DNA polimerasa III (*dnaE*), el factor terminación de la transcripción *nusA*, la DNA recombinasa *spoIVCA* y la DNA girasa *gyrB*. Estos resultados indican que ComS sería responsable de la activación de genes implicados en la replicación del eDNA y el metabolismo de los ácidos nucleicos.

Además de los genes relacionados con el DNA, un elevado porcentaje de los genes inhibidos (aproximadamente el 13 % del total en ambos puntos) corresponde a genes implicados en la traducción del RNA. Entre ellos se encuentran los genes que codifican para los factores de iniciación IF-I y 3 (*infA* y *C*), para el factor de elongación G (*fusA*) y para numerosas proteínas ribosomales. Además, entre los genes de metabolismo se observa una considerable inhibición de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos (Fig.16). Por tanto, puesto que en condiciones normales ComS estaría implicado en la activación de diversos procesos celulares como son la motilidad o la síntesis de DNA en un grupo de la población, en ausencia de ComS no sólo se inhibirá la replicación del DNA sino que también disminuirá la síntesis de proteínas relacionadas con dichos procesos.

Como era de esperar, entre los genes con mayor inhibición se detectaron *comS* y los genes del operón *srf*, ya que la mutación en *comS* puede afectar a la estabilidad del RNA mensajero del operón. Entre los genes de competencia temprana aparece además un efecto que no se había descrito antes

sobre *oppF*, gen que codifica para la subunidad ATPasa de la permeasa *opp* implicada en la detección de las señales de *quorum sensing*. Este resultado apunta a que ComS podría ejercer un efecto regulador sobre la permeasa *opp* activando así un posible sistema de retroalimentación positiva de su propia síntesis, puesto que el transportador Opp está implicado en la activación de ComA.

## 2.2 Genes inducidos en el mutante $\Delta comS$

Al igual que en el caso de los genes inhibidos descritos en el apartado anterior, el perfil transcripcional de los genes inducidos en el mutante  $\Delta comS$  varía poco de las 5:30 h a las 6 h (fig.15B). El total de genes identificados en ambos casos es de 115 y 127 respectivamente.

El 31,3 % a las 5:30 h y el 26,8 % a las 6 h de los genes inducidos están relacionados con el metabolismo. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los genes inhibidos, al subdividir el grupo en categorías funcionales relacionadas con el metabolismo (fig.16B) vemos que la mayoría de los genes están relacionados con vías específicas y señalización (58,3 % y 58,8 % a las 5:30 h y 6h respectivamente; porcentaje expresado en relación al total de genes englobados en el grupo “Metabolismo”) y en menor grado con el metabolismo de aminoácidos (25 % y 23,2 %). El porcentaje de genes implicados en metabolismo de ácidos nucleicos no alcanza el 3 %. Por lo tanto, los mutantes en  $\Delta comS$  presentan inhibición en el metabolismo de ácidos nucleicos y en la activación de vías específicas (como por ejemplo la biosíntesis de la acetoina o la síntesis de pectato liasa). Aunque también se detectan genes inducidos relacionados con el DNA, se trata de genes implicados principalmente en reparación y segregación del DNA, como *radC* o *ydiH*.

Finalmente, también se pudo observar en el mutante  $\Delta comS$  la inducción de genes relacionados con la producción de matriz extracelular (*sipW*), de exoproteasas (*aprE*) y de esporulación (*rapA*), todos ellos procesos que *B. subtilis* normalmente desarrolla en fase estacionaria.

## 3. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo muestran por primera vez la implicación del gen *comS* en la producción de eDNA y en diversos procesos celulares a parte del previamente descrito en el desarrollo de la competencia. No obstante, la actividad de *comS* parece estar condicionada por algún factor adicional aún por identificar, puesto que la complementación de los mutantes  $\Delta comS$  no es suficiente para restablecer el fenotipo silvestre, mientras que la adición de una copia extra sin alterar

el operón *srf* incrementa el efecto de ComS tanto en la producción de eDNA como en desarrollo de la competencia.

Asimismo, los resultados apuntan a que ComS ejerce su actividad a bajas concentraciones, actuando como un regulador implicado en diversos procesos celulares tal y como refleja el estudio del perfil transcripcional del mutante  $\Delta comS$  mediante la técnica de *microarrays*. Con este estudio se demuestra por primera vez una relación entre ComS y la motilidad. Además de afectar a la motilidad, ComS regula numerosos genes implicados en el metabolismo de ácidos nucleicos y en la replicación del DNA, así como en la síntesis de proteínas.

## CAPÍTULO 2: IMPLICACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE eDNA EN *B. subtilis*

Experimentos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que mutantes afectados en los genes de motilidad *sigD* y *hag* eran defectivos en la producción de eDNA. Por otra parte, se demostró que los genes de competencia tardía inhiben la motilidad (Liu & Zuber, 1998) mientras que en el capítulo anterior hemos podido establecer una relación positiva entre la competencia temprana (*comS*), la motilidad y la producción de eDNA. Por ello decidimos estudiar la relación existente entre los procesos de producción de eDNA y el desarrollo de la motilidad.

### 1. En ausencia de motilidad se inhibe la producción de eDNA

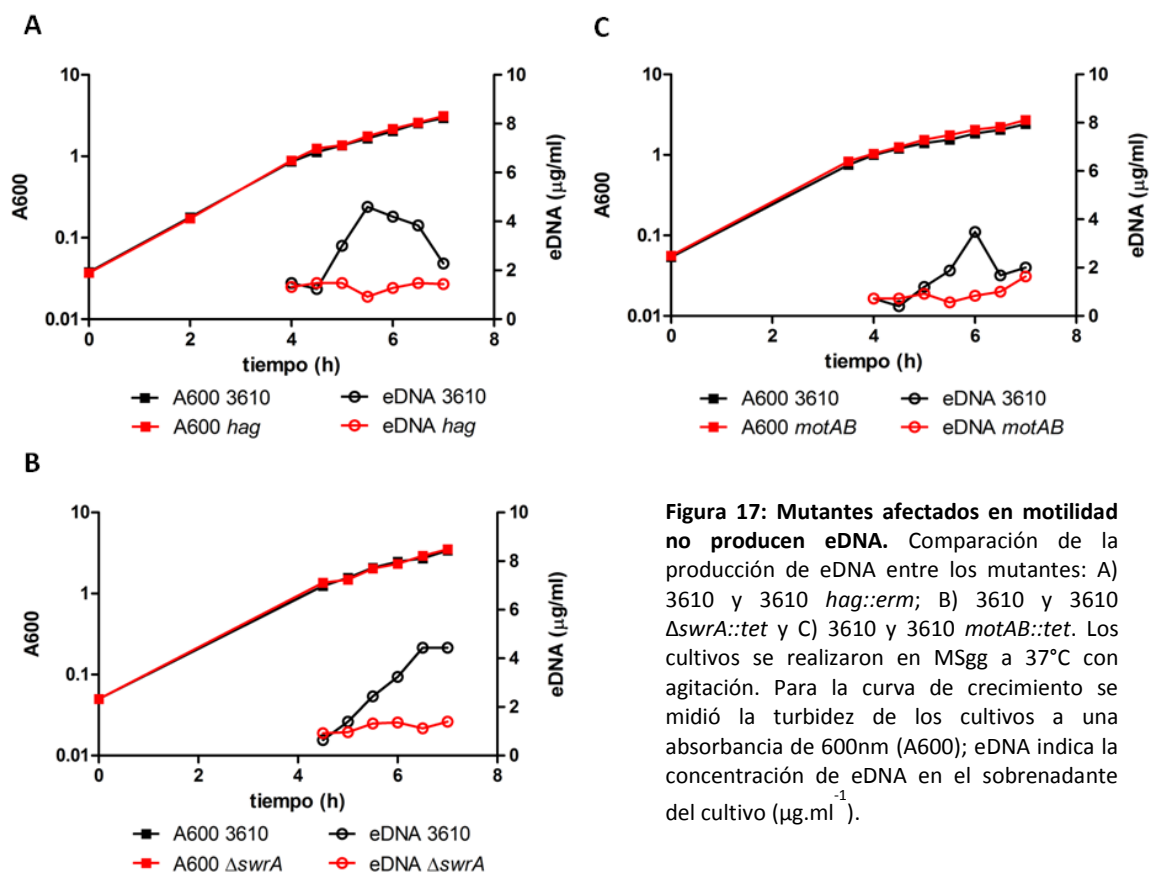
#### 1.1 La producción de eDNA se relaciona con el desarrollo de flagelos funcionales

Durante la fase de crecimiento exponencial, las células de *B. subtilis* coexisten bajo dos fenotipos diferentes: como células móviles y como células sésiles que forman cadenas. Este fenómeno de biestabilidad depende de la actividad del *master regulator*  $\sigma^D$  y de la proteína SwrA, la cual induce la transcripción del operón *fla/che* amplificando la transcripción de *sigD* (Calvio *et al.*, 2005; Mordini *et al.*, 2013; Mukherjee & Kearns 2014).

Por ello se decidió investigar la producción de eDNA en un mutante 3610  $\Delta swrA::tet$ , el cual se caracteriza por presentar un menor número de células con motilidad (aunque sigue manteniendo la motilidad tipo *swimming*) y por carecer por completo de *swarming*, un tipo de motilidad de carácter social que se da en medio semi-sólido (Ghelardi *et al.*, 2012). A modo de control se analizó también la producción de eDNA en el mutante 3610 *hag::erm* (fig.17A). Se observó que el mutante *swrA* es defectivo en la producción de eDNA (fig.17B), por lo tanto, en ausencia del regulador *swrA* responsable de activar el *swarming* se inhibe la producción de eDNA.

En conjunto, los mutantes afectados en motilidad en los cuales se ha estudiado la producción de eDNA (*hag*, *sigD* y  $\Delta swrA$ ) tienen de una forma u otra comprometida la estructura flagelar completa. Es por ello que el siguiente paso consistió en estudiar a un mutante afectado en una proteína del flagelo, que le permitiera sintetizar flagelos estructuralmente completos pero no funcionales. Para ello se utilizó al mutante en las proteínas MotA y MotB. Ambas proteínas forman parte del cuerpo basal del flagelo y son las responsables de generar la fuerza protón motriz necesaria para la rotación.

El mutante 3610 *motAB::tet* es por tanto capaz de generar la estructura completa del flagelo pero ésta no puede rotar por lo que la célula carece de motilidad. Se trata de un mutante que presenta una morfología mucosa debido a la sobreexpresión y consecuente acumulación de poli- $\gamma$ -glutamato (PGA) (Chan *et al.*, 2014). Al analizar el mutante *motAB* en cultivo en Mmsg pudimos comprobar que también es defectivo en la producción de eDNA (fig.17C). Por lo tanto, podemos concluir que para que una población de *B. subtilis* produzca eDNA sería necesario que haya células que expresen los genes de motilidad y que además las estructuras flagelares fueran funcionales.



**Figura 17: Mutantes afectados en motilidad no producen eDNA.** Comparación de la producción de eDNA entre los mutantes: A) 3610 y 3610 *hag::erm*; B) 3610 y 3610  $\Delta\text{swrA}::\text{tet}$  y C) 3610 y 3610 *motAB::tet*. Los cultivos se realizaron en Mmsg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600); eDNA indica la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ).

## 1.2 La ausencia de motilidad afecta a la acumulación de DNA en una subpoblación de células

Con los experimentos realizados hasta el momento se ha demostrado que la motilidad es necesaria para la correcta producción de eDNA. Sin embargo, se desconoce si la ausencia de eDNA observada en los sobrenadantes de los cultivos de estos mutantes se debe a un problema en la propia síntesis del eDNA o, por el contrario, a un problema en el proceso de su liberación al medio extracelular, ya

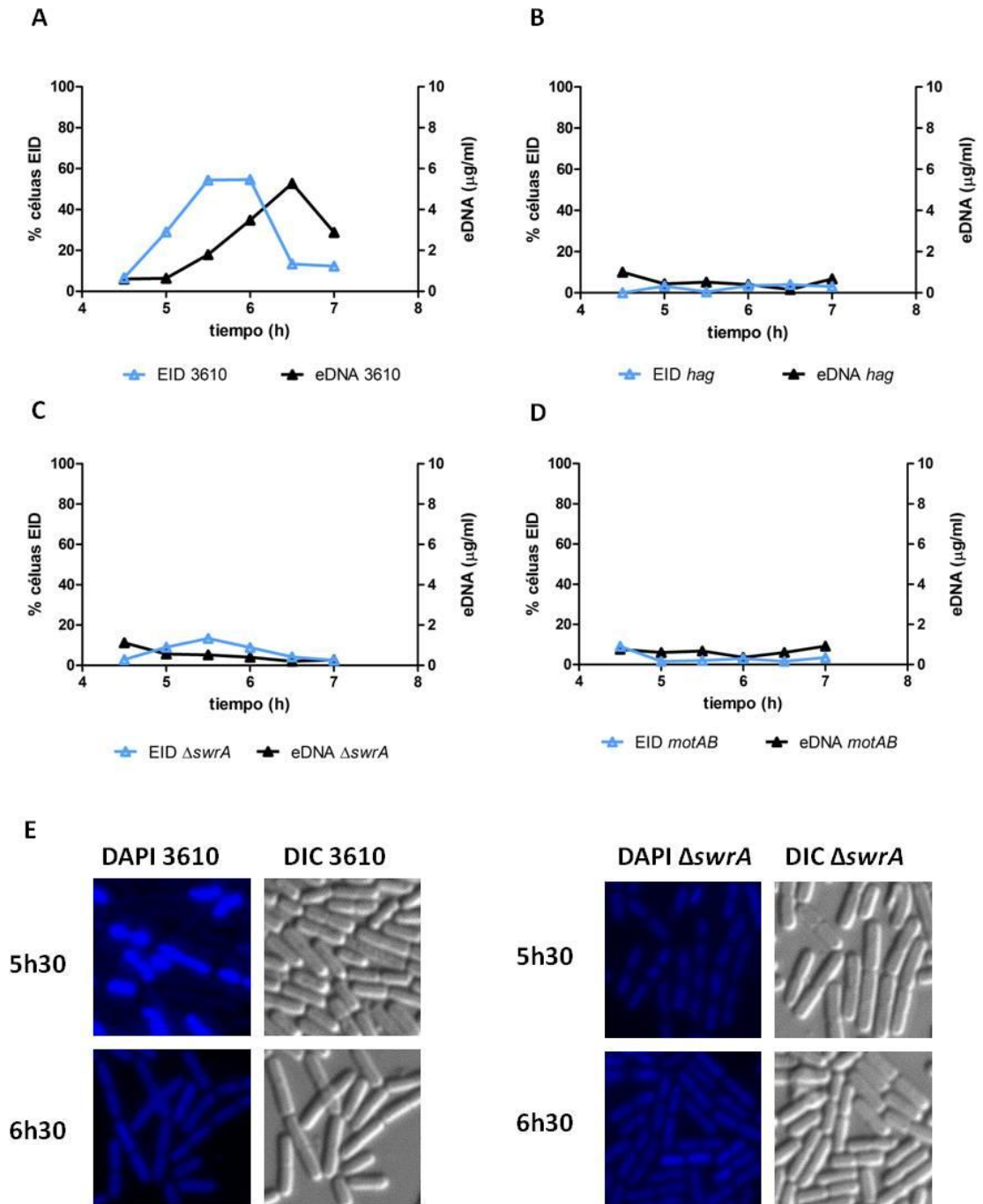
que se ha propuesto que el eDNA es exportado mediante transporte activo a través de la membrana por un sistema aún desconocido (Zafra *et al.*, 2012).

Para investigar este aspecto, se analizó la producción intracelular de DNA empleando un marcaje específico fluorescente con el compuesto 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Para este análisis nos basamos en los resultados publicados por Zafra *et al.* 2012, donde se demostró la existencia de una subpoblación de células con una elevada intensidad de marcaje fluorescente con DAPI (a las que llamaremos EID = Elevada Intensidad de DAPI), que se correspondería con una mayor cantidad de DNA intracelular. Se observó que en la estirpe silvestre el número de células EID varía a lo largo del tiempo, presentando un máximo en el momento previo a la máxima concentración de eDNA en el sobrenadante. Sin embargo, este tipo de células son prácticamente inexistentes en los mutantes que no producen eDNA. Considerando las elevadas cantidades de DNA intracelular que deben tener las células responsables de la producción de eDNA en los momentos previos a su liberación, se argumentó que las células EID son en realidad las células productoras de eDNA.

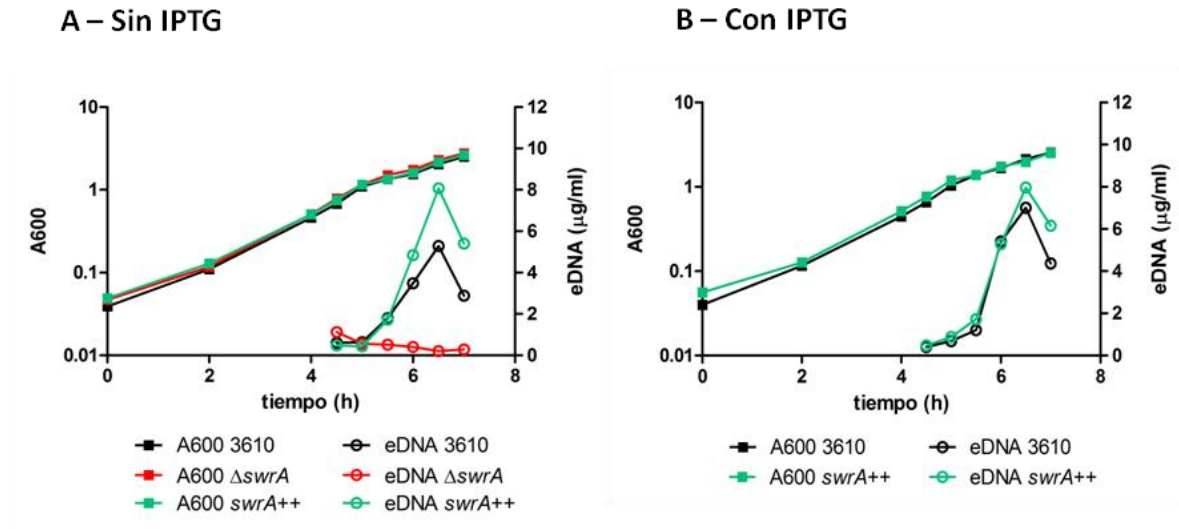
De este modo, en este trabajo se estudió la población de células EID presente en los mutantes de motilidad *hag*, *motAB* y  $\Delta$ *swrA*. En todos los casos se realizaron cultivos en MSgg en los cuales se tomaron muestras a lo largo de la curva de crecimiento, se trataron las células con DAPI y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. Tras realizar el conteo de células se pudo observar que la estirpe silvestre presenta un aumento del número de células EID aproximadamente media hora antes del máximo en la producción de eDNA hasta alcanzar el 30-60% de la población total, tras lo cual el porcentaje decae coincidiendo con el máximo en la concentración de eDNA en el sobrenadante (Fig. 18A). Por el contrario, ninguno de los tres mutantes presenta una variación en el número de células EID, manteniéndose en porcentajes muy bajos de entre 0-10% de células (fig.18B-D). De estos experimentos se deduce que en los mutantes afectados en motilidad no se sintetiza intracelularmente el DNA que posteriormente es secretado al medio.

Se procedió a analizar también el efecto de la sobreexpresión del gen *swrA* bajo la regulación del promotor inducible  $P_{spank}$  en un mutante 3610 *amyE::P\_{spank}-swrA* (fig.19). Los resultados mostraron que en ausencia de IPTG la producción de eDNA parece incrementarse frente al 3610 mientras que en presencia de IPTG no hay diferencias con el 3610.





**Figura 18: Efecto de las mutaciones *hag*,  $\Delta swrA$  y *motAB* en la síntesis de eDNA.** Comparación en el porcentaje de células con elevada intensidad de DAPI (EID) en relación a la producción de eDNA entre los mutantes 3610 (A), 3610 *hag::erm* (B), 3610 *motAB::tet* (C) y 3610  $\Delta swrA::tet$  (D). E) Imágenes de microscopía de células de los cultivos de 3610 y 3610  $\Delta swrA::tet$  teñidas con DAPI y tomadas a las 5:30 h y a las 6:30 h. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600); eDNA indica la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Las células se tiñeron con  $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de DAPI y se resuspendieron en PBS pH 7,4. DIC: Contraste Diferencial Interferencial.

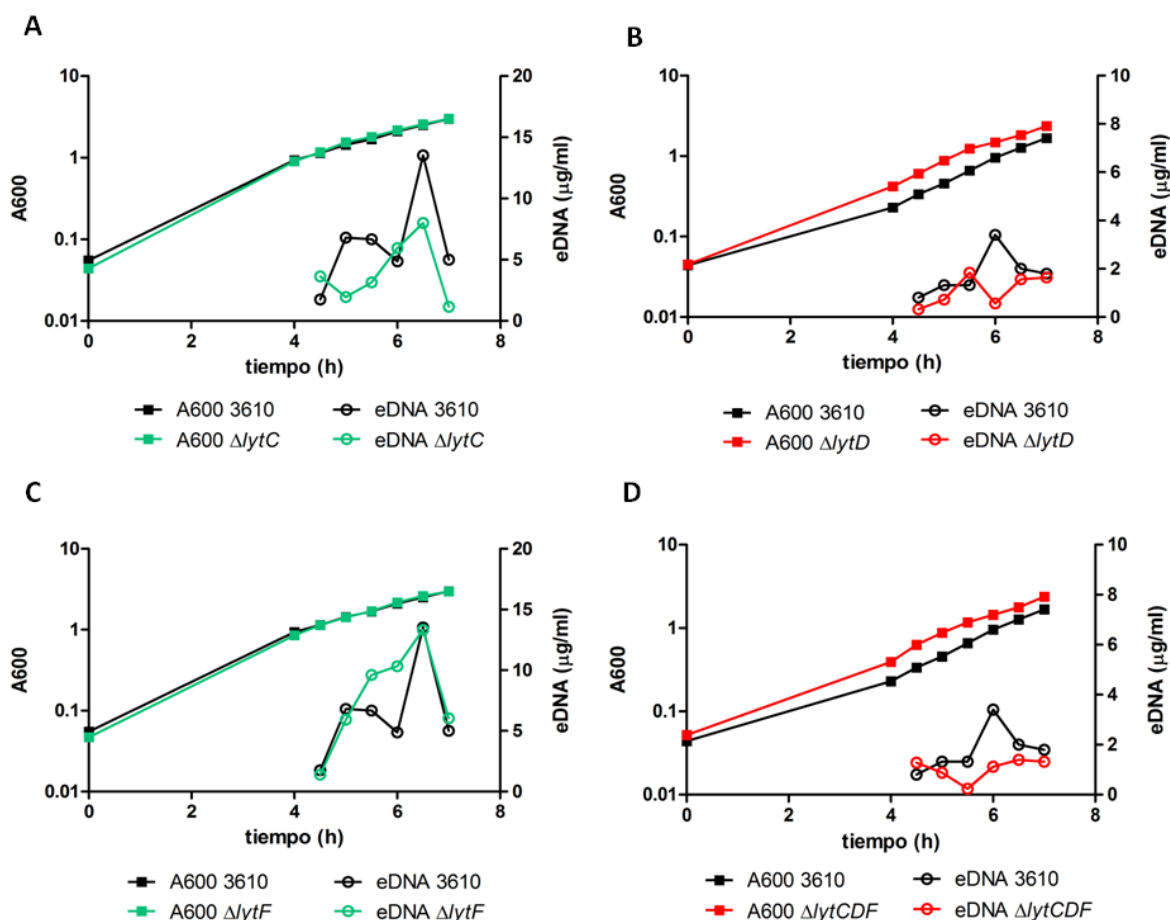


**Figura 19: Efecto de las mutaciones  $\Delta swrA$  y  $P_{spank-swrA}$  en la producción de eDNA.** Comparación de la producción de eDNA entre 3610, 3610  $\Delta swrA::tet$  y 3610  $amyE::P_{spank-swrA}$ , sin IPTG (A) y con IPTG (B). Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600); eDNA indica la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

### 1.3 Implicación de las autolisinas reguladas por $\sigma^D$ en la producción de eDNA

Para favorecer la motilidad las células necesitan existir de forma individualizada, a diferencia de lo que ocurre con las células sésiles que forman cadenas. Por ello, diversos genes que codifican para autolisinas están bajo la regulación del factor de transcripción  $\sigma^D$  y por tanto se co-transcriben con los genes de motilidad (Mukherjee & Kearns, 2014). Considerando que tal vez estos genes pudieran tener alguna implicación en la relación existente entre la motilidad y la producción de eDNA, se estudiaron los principales genes de autolisinas regulados por  $\sigma^D$ , *lytC*, *lytD* y *lytF*. Aunque *B. subtilis* posee numerosas autolisinas, LytC y D suponen el 95% de su actividad autolítica. En concreto LytC (cuya expresión está regulada en un 20% también por el factor de transcripción  $\sigma^A$ ), está implicado en procesos de motilidad, de división celular, de elongación celular, esporulación y de lisis celular inducida (Smith *et al.*, 2000). Tras analizar la producción de eDNA, pudimos observar que los mutantes *lytC* y *lytF* presentan un patrón de producción semejante al de la estirpe silvestre, mientras que el mutante *lytD* y el triple mutante *lytCDF* son defectivos en la producción de eDNA (Fig. 20). Este resultado implica que la glucosamidasa LytD (Beta-N-acetilglucosaminidasa), cuya expresión se

produce durante la fase exponencial bajo la regulación del factor de transcripción  $\sigma^D$  (Rashid *et al.*, 1995), podría estar implicada en la producción de eDNA.



**Figura 20: Efectos de las mutaciones *lytC*, *lytF*, *lytD* y *lytCDF* en la producción de eDNA.** Comparación de la producción de eDNA entre la cepa silvestre 3610 y los mutantes: A) 3610  $\Delta\text{lytC}::\text{kan}$ ; B) 3610  $\Delta\text{lytD}::\text{erm}$ ; C) 3610  $\Delta\text{lytF}::\text{tet}$ ; D) 3610  $\Delta\text{lytC}::\text{kan}$   $\Delta\text{lytD}::\text{erm}$   $\Delta\text{lytF}::\text{tet}$ . Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600); eDNA indica la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

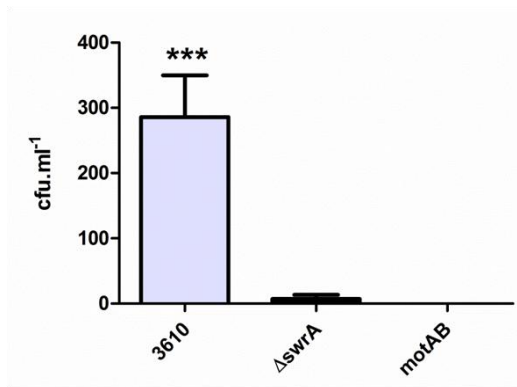
## 2. Relación entre los procesos de motilidad y competencia

Los resultados expuestos muestran la existencia de una relación entre la motilidad y la producción de eDNA. Así mismo, se demostró con anterioridad que la producción de eDNA está relacionada con genes de competencia temprana (Zafra *et al.*, 2012) y se ha descrito que los procesos de motilidad y competencia se hallan estrechamente co-regulados mediante el sistema ComS-MecA-ComK (Liu &

Zuber, 1998). En base a ello, nos planteamos estudiar si la ausencia de eDNA en los mutantes con motilidad se debe a un efecto indirecto sobre la competencia temprana.

### 2.1 La ausencia de motilidad no afecta a la competencia temprana

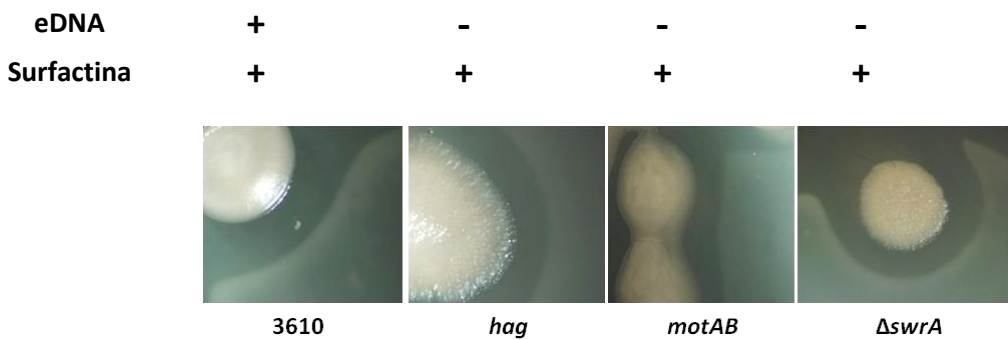
En primer lugar se estudió la eficiencia de transformación de los mutantes *motAB* y  $\Delta$ *swrA*. Para ello se transformaron dichos mutantes con DNA genómico de la estirpe 3610 *amyE::P<sub>feu</sub>-lacZ*, se seleccionaron los transformantes en el antibiótico correspondiente y se contabilizaron las unidades formadoras de colonia (ufd). Como se muestra en la fig.21, ambos mutantes tienen intensamente afectada la competencia.



**Figura 21: Los mutantes en motilidad tienen afectada la competencia.** Se analizó el efecto de las mutaciones 3610  $\Delta$ *swrA::tet* y 3610 *motAB::tet* en el desarrollo de la competencia tardía en comparación al 3610. Los mutantes se transformaron con DNA genómico de la estirpe 3610 *amyE::P<sub>feu</sub>-lacZ-spc* y se seleccionaron en placas de LB con espectinomicina, creciendo O.N. a 37°C. Se representó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (cfu.ml<sup>-1</sup>) y se realizó un análisis estadístico ANOVA ( $p < 0,05$ , CI 95%) para determinar las diferencias significativas (asteriscos).

Partiendo de estos resultados nos planteamos investigar si el efecto de la motilidad se producía a nivel de competencia temprana o sólo de la etapa tardía. Para ello se estudió en los mutantes de motilidad *hag*, *motAB* y  $\Delta$ *swrA* la producción de surfactina, cuya síntesis se activa en respuesta a las señales QS liberadas al medio al incrementar la densidad celular y disminuir la disponibilidad de nutrientes. Como se ha comentado anteriormente, el gen *comS* es el responsable de activar la competencia tardía y se encuentra ubicado en el interior del operón *srf*, dependiendo su transcripción del mismo promotor de la surfactina (Nakano *et al.*, 1991; Ogura *et al.*, 1999). Por lo tanto, la correcta producción de surfactina es indicador de que el gen *comS* se está transcribiendo correctamente y con ello la ruta de señalización de la competencia temprana. En las imágenes de la fig.22 se puede apreciar cómo, tras crecer las estirpes en medio DSM, todos los mutantes presentan un halo semi-transparente de surfactina alrededor de la masa celular de forma semejante al 3610,

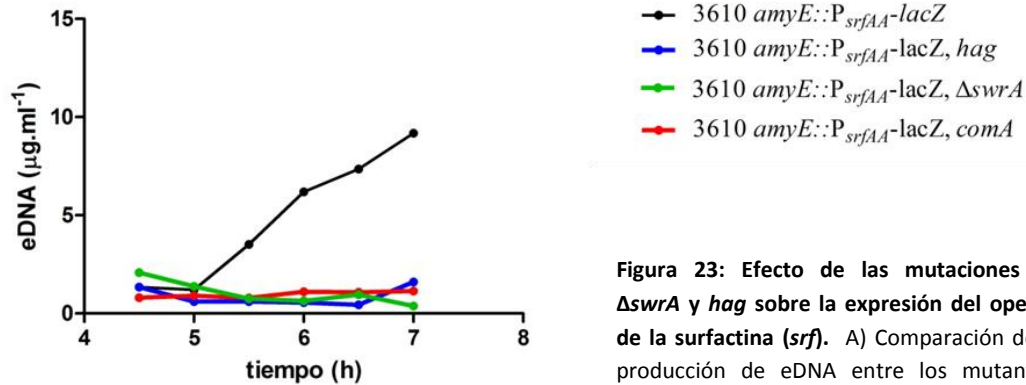
por lo que concluimos que la ausencia de motilidad no tiene efecto aparente sobre la síntesis de surfactina.



**Figura 22: La síntesis de surfactina no está relacionada con la motilidad.** Se muestra la producción de surfactina en diferentes mutantes de motilidad: 3610 *hag::erm*, 3610 *motAB::tet* y 3610 *ΔswrA::tet*, todos ellos defectivos en la producción de eDNA (-), junto con la producción de eDNA de la estirpe 3610 como control positivo. La producción de surfactina se estudió en placas DSM que se fotografiaron tras incubación de 24h a 37°C. La surfactina se visualiza como un halo alrededor de la colonia.

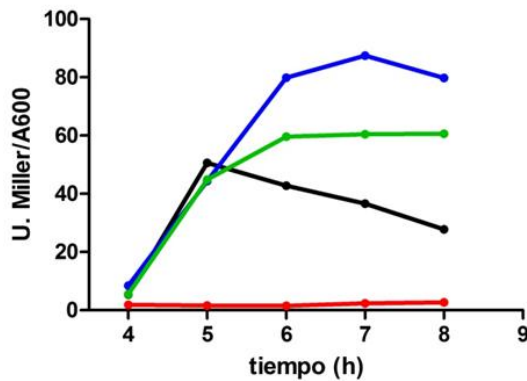
Este resultado se confirmó analizando la expresión del promotor de la surfactina  $P_{srf}$  fusionado al gen que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $amyE::P_{srf}-lacZ$ ) durante una curva de crecimiento, en mutantes afectados en los genes de motilidad *hag* y *ΔswrA* (fig.23). Como control negativo se utilizó un mutante en *comA*, el cual no produce surfactina al no poder activar la transcripción del operón *srf*. Los resultados obtenidos muestran como ambos mutantes afectados en motilidad poseen una elevada expresión del promotor de la surfactina, superior incluso a la del 3610. Se confirma por tanto que la expresión de los genes de producción de surfactina y *comS* no están reprimidos en los mutantes de motilidad, por lo que la reducida competencia de estos mutantes no está relacionada con problemas en la etapa temprana de la competencia.

A



**Figura 23: Efecto de las mutaciones en  $\Delta\text{swrA}$  y *hag* sobre la expresión del operón de la surfactina (*srf*).** A) Comparación de la producción de eDNA entre los mutantes: 3610 *amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ* (control positivo); 3610 *amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ comA::Tn917* (control negativo); 3610 *amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ hag::erm* y 3610 *amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ  $\Delta\text{swrA}::\text{tet}$* . Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); B) cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular en las mismas estirpes, expresada en Unidades Miller.

B

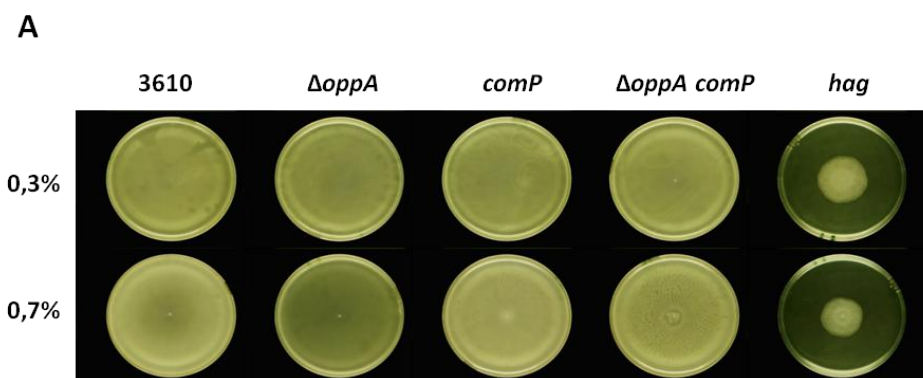


## 2.2 Las señales de quorum sensing (QS) no afectan al desarrollo de la motilidad

Tanto la competencia como la producción de eDNA son comportamientos sociales que dependen de la densidad celular y que están regulados por señales de QS (Comella & Grossman, 2005; Zafra *et al.*, 2012). Los dos principales receptores de señales de QS que posee *B. subtilis* son *oppA* y *comP* (Salomon *et al.*, 1995; Lazazzera *et al.*, 1997). Las mutaciones en ambos genes inhiben la producción de eDNA (Zafra *et al.*, 2012), siendo además ComP necesaria para la activación de la competencia temprana debido a su actividad kinasa fosforilando al regulador ComA. A fin de comprobar si el defecto en la producción de eDNA de los mutantes en QS está relacionado con la motilidad se analizó la capacidad de motilidad *swimming* y *swarming* en placas de LB agar 0,3 % y 0,6 % respectivamente, de los mutantes  $\Delta\text{oppA}$ , *comP* y del doble mutante  $\Delta\text{oppA comP}$ . Como control negativo se utilizó el mutante *hag*. Los resultados muestran como los mutantes afectados en la detección de las señales

de QS asociadas a competencia y producción de eDNA poseen una motilidad *swimming* y *swarming* semejante a la de la estirpe silvestre 3610 (fig.24).

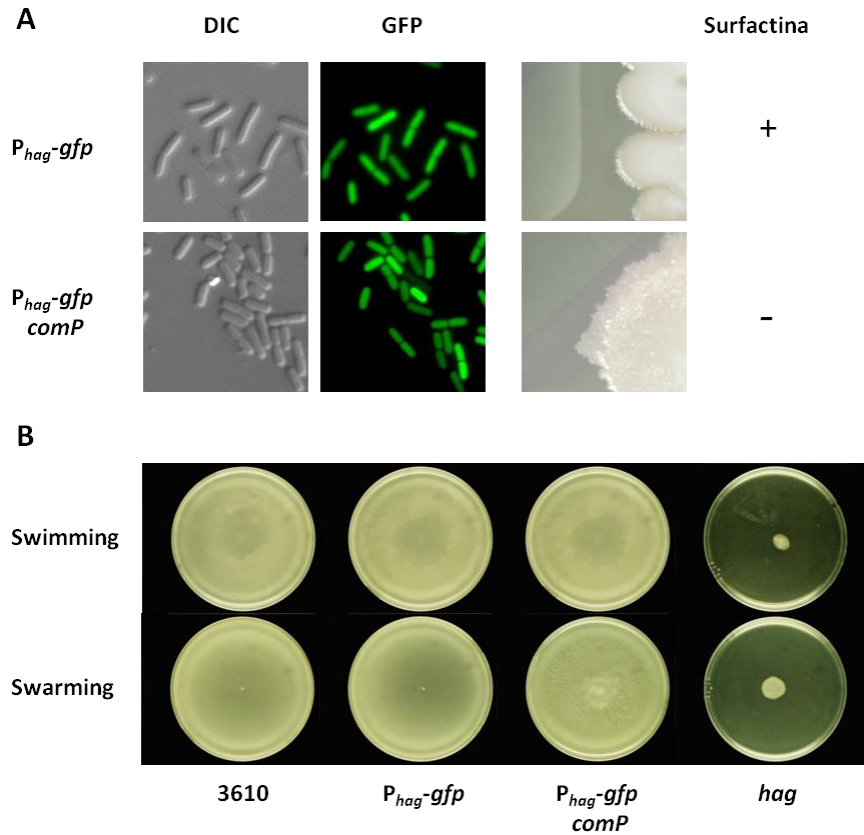
Para complementar este resultado se utilizó la construcción  $P_{hag}$ -*gfp*, que asocia la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) al promotor natural del gen de la flagelina ( $P_{hag}$ ). Esta construcción se utilizó en la estirpe silvestre como control positivo y en el mutante *comP*. Los resultados muestran que en el mutante *comP* se observan células con fluorescencia verde, es decir, células que están expresando el gen de la flagelina de forma similar a la estirpe silvestre (fig.25). Se concluye por tanto que los sistemas de señalización de QS regulados por las proteínas sensoras OppA y ComP no son necesarios para el desarrollo de la motilidad.



**Figura 24: La motilidad no se ve afectada por la disrupción de los receptores de *quorum sensing*.** Comprobación de motilidad mediante prueba de *swimming* y *swarming* de los mutantes 3610  $\Delta spo0K358::erm$  ( $\Delta oppA$ ), 3610 *comP::mini-Tn10* y 3610  $\Delta oppA::erm$  *comP::mini-Tn10* en placas LB de 0,3 y 0,7 % agar respectivamente, inoculadas por picadura e incubadas 24h a 37°C. Se utilizó 3610 como control positivo y 3610 *hag::erm* como control negativo.

En resumen, se descarta que la motilidad esté afectando a los genes responsables del desarrollo de la etapa temprana de la competencia, por lo que el defecto en la motilidad estaría afectando exclusivamente al desarrollo de la competencia tardía. Se concluye además que la ausencia de motilidad no está afectando de forma indirecta a la producción de eDNA mediante la regulación de la competencia temprana





**Figura 25: La mutación en *comP* no afecta a la motilidad.** A) Se muestra como el mutante 3610  $P_{hag-gfp} comP::mini-Tn10$  presenta expresión del promotor de la flagelina (fluorescencia verde) mientras que se comprueba que tiene afectada la etapa temprana de competencia al no ser capaz de sintetizar surfactina (-). Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia a las 4h de crecimiento en cultivo líquido de MSgg con agitación. Prueba de surfactina en placas DSM visualizadas tras 24h a 37°C; B) Comprobación de motilidad mediante prueba de *swimming* y *swarming* en placas LB de 0,3 y 0,7 % agar respectivamente, inoculadas por picadura e incubadas 15h a 37°C. Se utilizó 3610 como control positivo y 3610 *hag::erm* como control negativo. DIC: Contraste Diferencial Interferencial.

### 3. Análisis del perfil transcripcional de mutantes en motilidad mediante microarrays

Con el fin de investigar los genes afectados en los mutantes de motilidad que pudieran estar implicados en la producción de eDNA, se realizó un análisis de la expresión génica de los mutantes  $\Delta swrA$  y *motAB* mediante la técnica de *microarrays*. Para ello, se comparó el perfil transcripcional de ambos mutantes con el perfil de la estirpe silvestre 3610 en distintos momentos de crecimiento del cultivo, mediante *microarrays* de oligonucleótidos basados en la secuencia del genoma de *B. subtilis* 168 (Britton *et al.*, 2002). Las estirpes se cultivaron en medio MSgg líquido y se tomaron muestras para aislamiento de RNA en dos momentos diferentes del cultivo. La primera muestra se tomó tras 5 h de crecimiento, momento previo al máximo de eDNA en el sobrenadante, y la segunda se tomó a



las 6 h, momento que se corresponde con el máximo de producción de eDNA. Se aplicó un análisis estadístico a los datos obtenidos, tras lo cual se seleccionaron los genes que presentaran un ratio (*Fold change*) > 2,0 y un *p-value* menor o igual a 0,8.

### 3.1 Perfil transcripcional de 3610 $\Delta swrA::tet$

En la fig.26 se muestra la expresión génica diferencial entre el 3610 y el mutante  $\Delta swrA$ . A las 5 h de crecimiento el número de genes inhibidos en el  $\Delta swrA$  es de 66 mientras que 45 son inducidos. A las 6 h se inhiben 62 genes y se inducen 29. El perfil varía considerablemente de una muestra a otra de tal forma que entre los genes inhibidos a las 5 y 6 horas solamente hay 13 coincidencias y entre los inducidos 2 (Anexo II).

Como se ha descrito anteriormente *swrA* regula al operón *fla/che*, y por tanto al conjunto de genes necesarios para la formación del flagelo. Es por ello que el mayor número de genes inhibidos en este mutante tanto a las 5 (15 genes) como a las 6 h (24 genes) se corresponde con genes de motilidad y quimiotaxis, entre los que se encuentra, como era de esperar, *sigD* (contabilizado en el grupo de reguladores transcripcionales).

A partir de este punto ambos perfiles varían. Mientras que a las 5 h el mayor número de genes inhibidos se relaciona con funciones metabólicas (13 genes) y con esporulación (7 genes), a las 6 h son genes relacionados con profagos (6 genes) y con producción de matriz extracelular (4 genes). Cabe destacar que en ambos casos hay un elevado número de genes desconocidos (>10 genes).

Entre los genes relacionados con el metabolismo, a las 5 h destaca la inhibición en los pertenecientes al operón *puc* implicado en el metabolismo de ácidos nucleicos y en concreto, en la degradación de purinas. Cabe mencionar en relación al DNA, la intensa inhibición de hasta 10 veces del gen *spoIVCA*, el cual codifica para una DNA recombinasa implicada en esporulación.

Se puede observar también la inhibición del gen *capC* implicado en la biosíntesis del biopolímero poli- $\gamma$ -glutamato (PGA), lo que concuerda con los resultados de Osera *et al.*, 2009 en los que asociaron *swrA* a la producción de PGA. Entre los genes inhibidos asociados a profagos se encuentran genes derivados del profago *SP $\beta$ c2* (mayoritariamente a las 5 h) y genes de PBSX (mayoritariamente a las 6 h). Finalmente la única autolisina que aparece inhibida en el mutante  $\Delta swrA$  es *lytD*, la cual hemos demostrado que podría estar relacionada con la producción de eDNA.

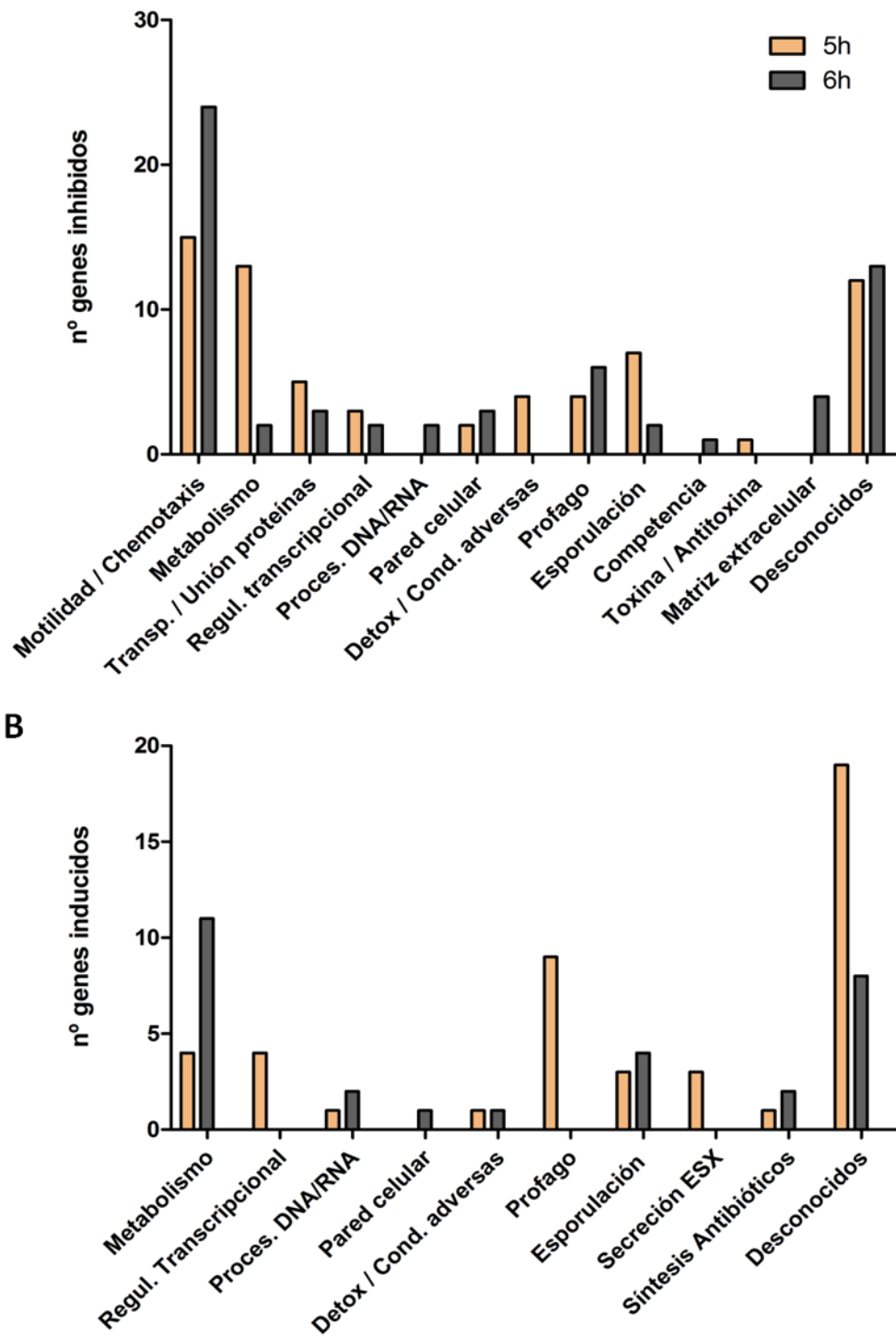


Figura 26: Representación según la función biológica de los genes que presentan expresión diferencial entre el mutante 3610  $\Delta swrA::tet$  y la estirpe silvestre 3610. A) Genes inhibidos en el mutante y B) genes inducidos en el mutante. Comparación mediante la técnica de *microarrays* de los perfiles transcripcionales de estas estirpes en el momento previo a la máxima producción de eDNA (5h) y en el momento de máxima producción (6h). Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación.

En cuanto a los genes inducidos cabe destacar un elevado número de genes relacionados con profagos (9 genes) a las 5 h, que dejan de detectarse a las 6 h. Así mismo se encuentran inducidos a las 5 h genes de regulación transcripcional (4 genes) y del sistema de secreción de proteínas Esat-6 (ESX) (3 genes) que tampoco aparecen a las 6 h. Por otro lado, a las 6 h los genes inducidos se relacionan principalmente con funciones de metabolismo (11 genes) y de esporulación (4 genes). Además empiezan a inducirse genes relacionados con la pared celular ausentes a las 5 h.

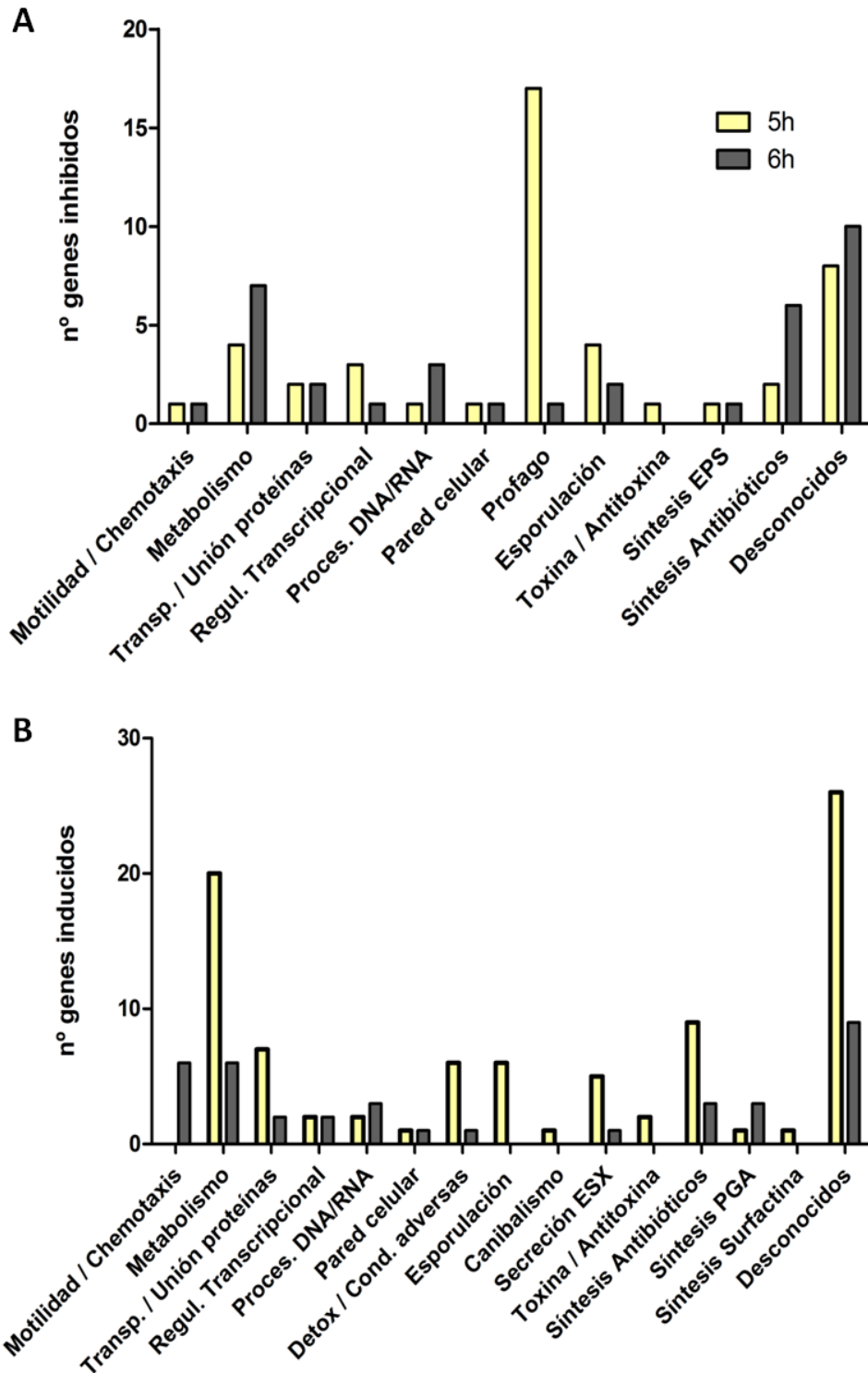
### **3.2 Perfil transcripcional de 3610 *motAB::tet***

En la fig.27 se muestran las funciones de los genes inhibidos e inducidos en el mutante *motAB* frente a 3610. El número de genes inhibidos a las 5 h es de 45, mientras que los inducidos son 90. A las 6 h, se reducen a 35 genes inhibidos frente a 37 inducidos. Entre los genes inhibidos a las 5 h destacan los genes relacionados con el profago PBSX (17 genes). A las 6 h sin embargo el mayor número de genes inhibidos están más relacionados con metabolismo (7 genes), síntesis de antibióticos (6 genes) y con el procesamiento del DNA (3 genes).

Entre los genes inhibidos hay muy pocos relacionados con la motilidad (tan sólo *swrA* a las 5 h y *motA* a las 6 h). Esto tiene sentido ya que el mutante *motAB* es capaz de sintetizar la estructura completa del flagelo por lo que los genes relacionados con la motilidad se deben estar expresando.

Por otro lado, es interesante destacar la inhibición del gen *comK*, regulador principal del desarrollo de la competencia tardía. Este resultado concuerda con la imposibilidad de transformar el mutante *motAB* que se observó en los experimentos anteriores. Finalmente, entre los genes inhibidos relacionados con la síntesis del DNA se detectó la endonucleasa *ydiR* tanto a las 5 como a las 6 h.

En lo referente a los genes inducidos a las 5 h, muchos están relacionados con funciones metabólicas (20 genes), en concreto con el metabolismo de los lípidos y por tanto con la membrana celular. Esto podría correlacionarse con el hecho de que las colonias de *motAB* poseen una morfología mucosa que posiblemente le suponga problemas a nivel de la membrana. En este sentido no sorprende encontrar la inducción de genes relacionados con la síntesis de PGA (Chan *et al.*, 2014) tanto a las 5 como a las 6 h.

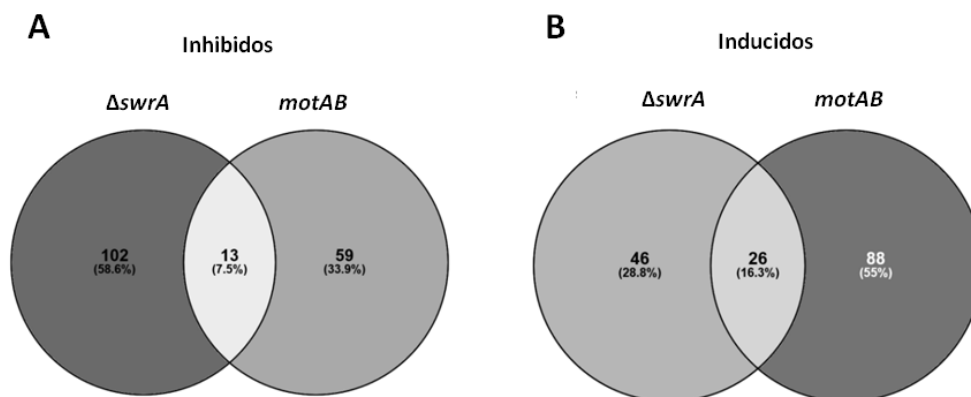


**Figura 27:** Representación según la función biológica de los genes que presentan expresión diferencial entre el mutante 3610 *motAB::tet* y la estirpe silvestre 3610. A) Genes inhibidos en el mutante y B) genes inducidos en el mutante. Comparación mediante la técnica de *microarrays* de los perfiles transcripcionales de estas estirpes en el momento previo a la máxima producción de eDNA (5h) y en el momento de máxima producción (6h). Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación.

Llama la atención que a las 6 h aparezcan inducidos varios genes relacionados con la motilidad, entre ellos *sigD* y *swrB*. Esto puede deberse a un desajuste en la regulación de la expresión de los genes de motilidad. Puesto que se trata de una interpretación relativa a la expresión de dichos genes en el 3610, este resultado puede deberse a que en el 3610 estos genes dejan de expresarse mientras que en el mutante *motAB* se siguen expresando de forma anómala. Por otro lado, también se detectaron genes inducidos relacionados con la reparación del DNA (*yisT*, *nfi*). Finalmente, el hecho de que estén inducidos genes como *pel* o *srfAB*, que están bajo la regulación de *comA*, apoya nuestros resultados según los cuales la fase temprana de la competencia no se ve afectada por la motilidad.

### 3.3 Comparación entre los perfiles transcripcionales de *motAB* y $\Delta swrA$

Al comparar el total de genes inhibidos en  $\Delta swrA$  (tanto a las 5 como a las 6 h) frente al total de genes inhibidos en el mutante *motAB*, obtenemos 13 coincidencias (fig.28). El mutante *swrA* presenta un mayor porcentaje de genes inhibidos que *motAB*, lo que concuerda con el papel de molécula reguladora que posee *swrA* frente al papel estructural de *motAB*. Por el contrario, el mutante *motAB* posee un mayor número de genes inducidos. En total el número de coincidencias en los genes inducidos entre ambos mutantes es de 26 genes.



**Figura 28: Comparación entre los perfiles transcripcionales de los mutantes  $\Delta swrA$  y *motAB*.** Diagrama de Venny para representar el número de genes significativamente A) inhibidos y B) inducidos, obtenidos mediante análisis por *microarray* de los perfiles transcripcionales diferenciales de los mutantes 3610  $\Delta swrA::tet$  y 3610 *motAB::tet*. Mediante escala de grises se representa el % de genes compartidos o específicos de cada mutante.

En la tabla 6 se listan los genes inhibidos coincidentes en ambos mutantes. El gen *btlD* codifica para la acetiltransferasa BtlD, implicada en el procesamiento de la espermina, poliamina predominante en *B. subtilis* necesaria para el correcto crecimiento y diferenciación celular (Woolridge *et al.*, 1999).

Tabla 6: Genes inhibidos en común entre los perfiles transcripcionales de los mutantes 3610  $\Delta swrA::tet$  y 3610  $motAB::tet$

Genes	Función
<i>bltD</i>	Metabolismo de aminoácidos – síntesis espermina.
<i>ndhF</i>	Bioenergética de la membrana - oxidoreductasa
<i>spoIVB</i>	Esporulación – formación de corteza y cubierta de la espora
<i>xkdJ</i>	Profago PBSX
<i>xkdN</i>	Profago PBSX
<i>xkdU</i>	Profago PBSX
<i>ygxB</i>	Esporulación – función desconocida
<i>yodP</i>	Actividad N-acetil tranferasa - desconocida
<i>yotG</i>	Proteína derivada del profago SP $\beta$ c2
<i>ypfB / jofB</i>	Desconocida
<i>ywhL</i>	Desconocida
<i>yxil</i>	Desconocida
<i>ysiK</i>	Desconocida

Mientras que *ndhF* codifica para una NADH deshidrogenasa (subunidad 5) implicada en la bioenergética de la membrana, SpoIVB es una proteína señalizadora implicada en la activación y procesamiento del factor pro-sigma K durante la fase IV de la esporulación. También implicado en esporulación aunque de función desconocida es el gen *ygxB*.

Distintos genes de profago PBSX se hayan inhibidos, así como *yotG*, gen que codifica para una proteína derivada del profago SP $\beta$ c2.

Finalmente el resto de genes no tienen una función biológica conocida. Se ha descrito que *yodP* codifica para una acetiltransferasa pero se desconoce su papel aunque se ha descartado que el *cluster* genómico al que pertenece, *yodT-yodS-yodR-yodQ-yodP-kamA*, esté implicado en esporulación o en la regulación osmótica, tanto en medio rico como en medio mínimo (Müller *et al.*, 2011).

En cuanto a los genes inducidos (tabla 7) que ambos mutantes comparten en su perfil transcripcional, se hallan genes relacionados con procesos metabólicos, tanto de lípidos como de aminoácidos o nucleótidos, así como genes implicados en el proceso de esporulación, especialmente en su regulación (*rapA* y *rapB*).

Tabla 7: Genes inducidos en común entre los perfiles transcripcionales de los mutantes 3610  $\Delta swrA::tet$  y 3610  $motAB::tet$

Genes	Función
<i>bcd</i>	Metabolismo de lípidos
<i>bpr</i>	Metabolismo de aminoácidos - bacilopeptidasa
<i>nprE</i>	Metabolismo de aminoácidos – metaloproteasa extracelular neutral
<i>pel</i>	Pectato liasa
<i>rapA</i>	Esporulación
<i>rapB</i>	Esporulación
<i>spsF</i>	Esporulación – síntesis de la cubierta de polisacáridos
<i>ycdA</i>	Desconocido – lipoproteína de membrana
<i>ycdT</i>	Desconocido
<i>ydhS / gmuF</i>	Procesamiento metabólico de carbohidratos
<i>yfjC</i>	Desconocido
<i>yfjD</i>	Desconocido – lipoproteína de membrana
<i>yfjE</i>	Desconocido – Proteína transmembrana
<i>yfkN</i>	Metabolismo de nucleótidos – procesos catabólicos
<i>yitM</i>	Desconocido – Proteína transmembrana
<i>yoaJ</i>	Desconocido - semejante a expansina
<i>yqxl</i>	Desconocido
<i>yral</i>	Desconocido
<i>yueB</i>	Sistema de secreción de proteínas ESX
<i>yukA</i>	Sistema de secreción de proteínas ESX – unión a nucleótido
<i>yukB</i>	Sistema de secreción de proteínas ESX – unión a nucleótido
<i>yvcB</i>	Desconocido
<i>ywfD</i>	Producción de antibiotico - bacC
<i>ywql</i>	Desconocido
<i>ywqL / nfi</i>	Endonucleasa V
<i>ywsB</i>	Desconocido – Proteína de unión a la membrana

Cabe destacar la sobreexpresión de los genes relacionados con el sistema de secreción ESX y el gen *nfi*, el cual codifica para una endonucleasa tipo V.

En conjunto los genes inducidos codifican en su mayoría para proteínas de membrana o asociadas a la membrana.

#### 4. Conclusiones

A partir de los experimentos realizados en este capítulo podemos concluir que la falta de un correcto desarrollo y funcionalidad del flagelo afecta negativamente a la capacidad de sintetizar eDNA en *B. subtilis*. Entre los genes regulados por el operón *fla/che* demostramos también que un mutante en el gen que codifica para la autilisina LytD no es capaz de producir eDNA.

Los resultados muestran que la falta de motilidad no sólo afecta a la producción de eDNA sino que además inhibe el desarrollo de la competencia tardía sin afectar a los genes de competencia temprana. Asimismo, los experimentos demostraron que los sistemas de QS ComP y OppA no son necesarios para el correcto desarrollo de la motilidad.

Por otro lado, los experimentos con *microarrays* del mutante  $\Delta swrA$  confirmaron que los genes relacionados con la motilidad están afectados, y nos permitió describir el efecto sobre los genes relacionados con el catabolismo de ácidos nucleicos a las 5 h de cultivo, y con la reparación del DNA. Así mismo, los *microarrays* del mutante *motAB* mostraron escasa afectación de genes de motilidad, conforme a lo esperable, mientras que se puso de manifiesto un efecto importante sobre genes relacionados con profagos cuyo papel aún desconocemos. Finalmente, diversos genes de función desconocida se expresan de forma diferencial en ambos mutantes por lo que podrían estar relacionados con la producción del eDNA.



### **CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE eDNA EN LOS CUERPOS AÉREOS DE *B. subtilis* 3610**

El trabajo descrito en los capítulos anteriores se ha realizado con cultivos que favorecen el tipo de vida celular planctónico. Sin embargo, como ocurre en la mayoría de las especies bacterianas, las células de *B. subtilis* no viven principalmente de forma libre e individualizada sino que se organizan en comunidades multicelulares complejas, denominados cuerpos aéreos.

Dada la heterogeneidad poblacional presente en estas estructuras formadas por *B. subtilis* (Branda *et al.*, 2001; Kearns, 2008; van Gestel *et al.*, 2015; Ogura, 2016), cabe esperar que dependiendo de la función que cada subpoblación desempeñe le corresponda una distribución espacial determinada (Vlamakis *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha descrito que las células que van a esporular se ubican en los ápices de los cuerpos aéreos (Branda *et al.*, 2001), y que las células productoras de matriz extracelular son aquellas que forman parte de las cadenas celulares (van Gestel *et al.*, 2015). En lo que respecta a la población de células productoras de eDNA, su función ha sido estudiada en las biopelículas de diversos microorganismos. Uno de los ejemplos más representativos es el estudio de Allesen-Holm *et al.* 2006, en el que se identificó la localización de las células productoras durante todo el proceso de formación de la biopelícula y se describió el papel del eDNA como molécula estructural. Sin embargo, en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* se desconoce la función y distribución que tienen las células productoras de eDNA, aunque en estudios anteriores se descartó que el eDNA fuera necesario para la formación de cuerpos aéreos (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Zafra *et al.*, 2012; Moscoso & Claverys 2014). En este contexto, nos planteamos investigar la producción de eDNA y su localización en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610, y para ello se estudió la organización celular tridimensional interna de estas estructuras.

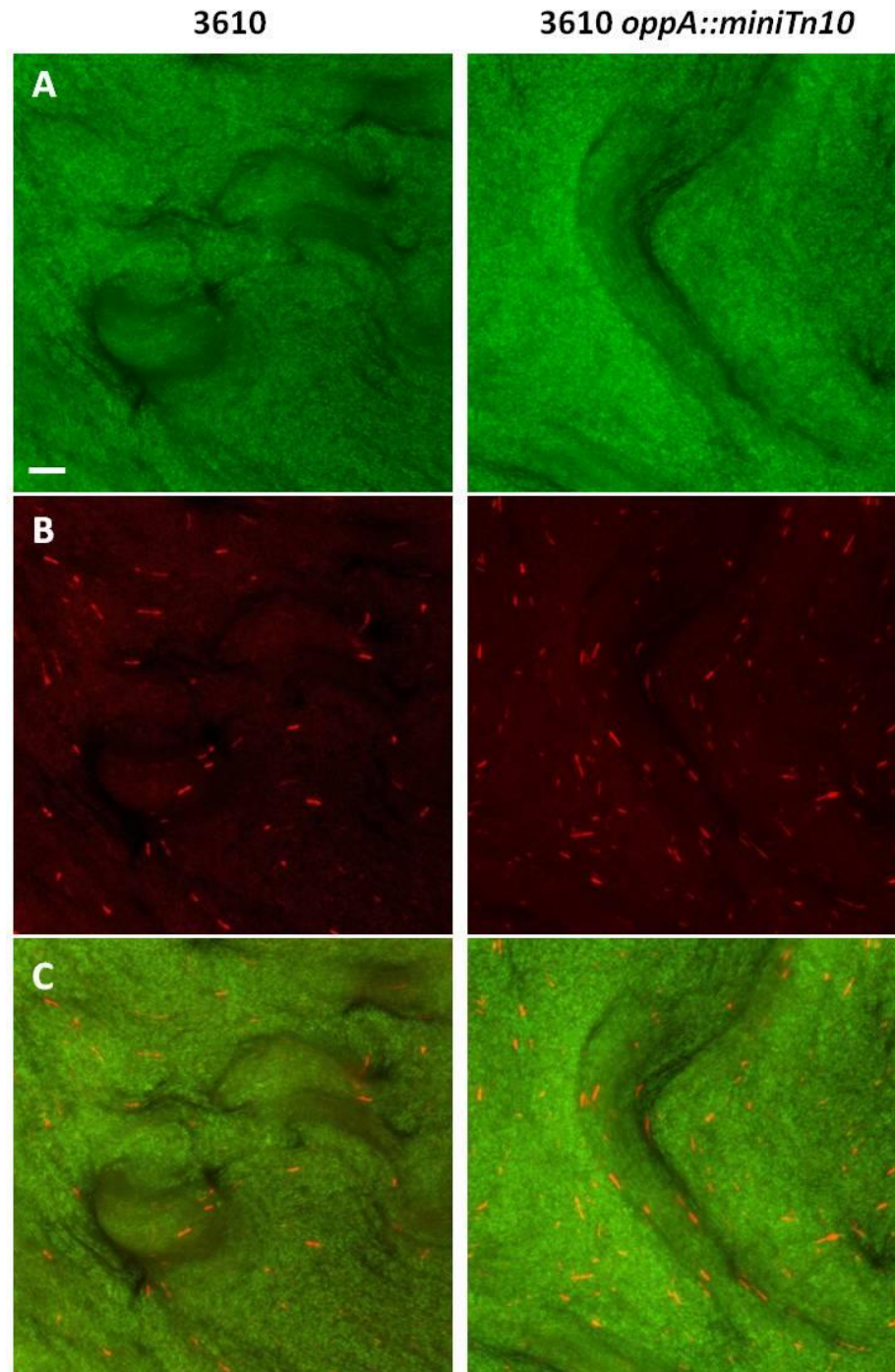
#### **1. Marcaje del eDNA en los cuerpos aéreos de *B. subtilis***

Para llevar a cabo la localización del eDNA en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610, se utilizó una tinción que permite distinguir entre células vivas y muertas, y que contiene dos compuestos que se intercalan en el DNA: i) SYTO 9, que marca con fluorescencia verde las células vivas, ya que puede penetrar a través de la membrana, y ii) ioduro de propidio que marca con fluorescencia roja el DNA que pueda haber en el medio extracelular así como en las células muertas, ya que solo penetra si hay

rotura en las membranas. De este modo comparamos el marcaje de la estirpe silvestre con el del mutante *oppA*, el cual no produce eDNA pero sí que es capaz de generar cuerpos aéreos de fenotipo similar al 3610.

Como se aprecia en la fig.29, las muestras se analizaron al microscopio confocal de fluorescencia donde se pudo observar que no hay diferencias en el patrón de tinción del ioduro de propidio entre el mutante defectivo en la producción de eDNA y la estirpe silvestre. En ambos casos se aprecia un patrón de escasas células repartidas de forma uniforme por los cuerpos aéreos. También puede apreciarse la presencia de un ligero fondo de marcaje en rojo, el cual podría ser DNA presente en la muestra o bien ser un artefacto derivado del proceso de preparación de la muestra.

En vista de los resultados decidimos probar también el método descrito por Allesen-Holm *et al.*, 2006, para marcar el eDNA en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando DDAO [7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-one)]. El DDAO permite marcar con fluorescencia roja específicamente el DNA, pero al no ser capaz de permear a través de la membrana sólo marca el DNA que se encuentra fuera de la célula. Se analizó la estirpe 3610 y tras incubar con el DDAO se visualizaron las preparaciones de *B. subtilis* 3610 con el microscopio de fluorescencia (datos no mostrados). Lo que pudimos observar es que tanto la estirpe silvestre como el control negativo presentaban el mismo patrón de marcaje rojo repartido de forma uniforme por la muestra, apoyando los resultados obtenidos mediante microscopía confocal.



**Figura 29: Marcaje de DNA en células vivas y muertas en los cuerpos aéreos de *B. subtilis*.** Comparación entre la estirpe silvestre 3610 y el mutante defectivo en la producción de eDNA 3610 *oppA::miniTn10*. A) marcaje con SYTO 9 del DNA de las células vivas (fluorescencia en verde); B) marcaje con ioduro de propidio del DNA presente en el medio extracelular y en las células muertas (fluorescencia en rojo); C) combinación de las imágenes A y B donde se aprecia la existencia de un escaso número de células muertas, similar en ambas estirpes. Colonia crecida en MSgg sólido, ON a 37°C. Imágenes tomadas con Microscopía Confocal de Fluorescencia. La barra representa 50µm.

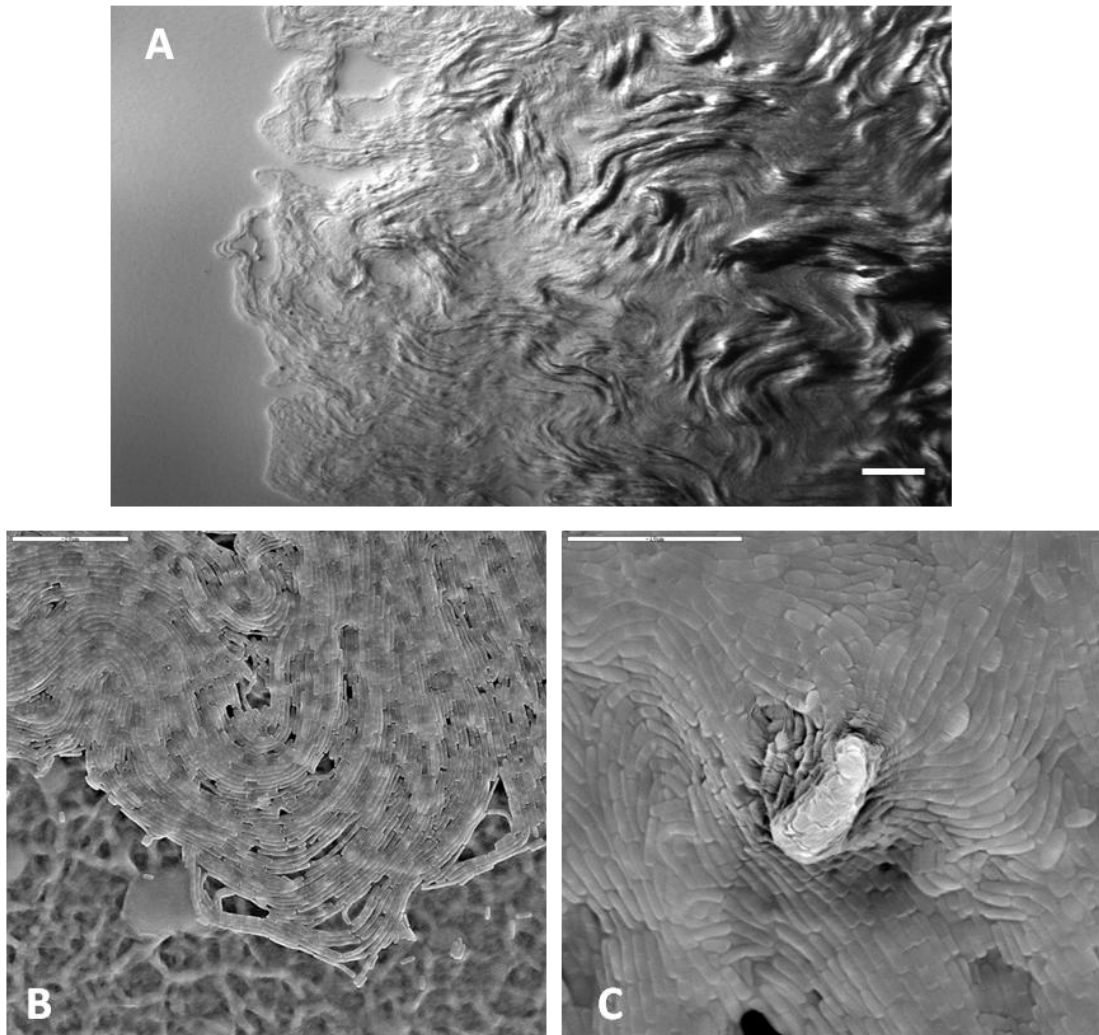
## **2. Organización celular en los cuerpos aéreos de *B. subtilis***

### **2.1 Las células en el interior de los cuerpos aéreos forman estructuras organizadas**

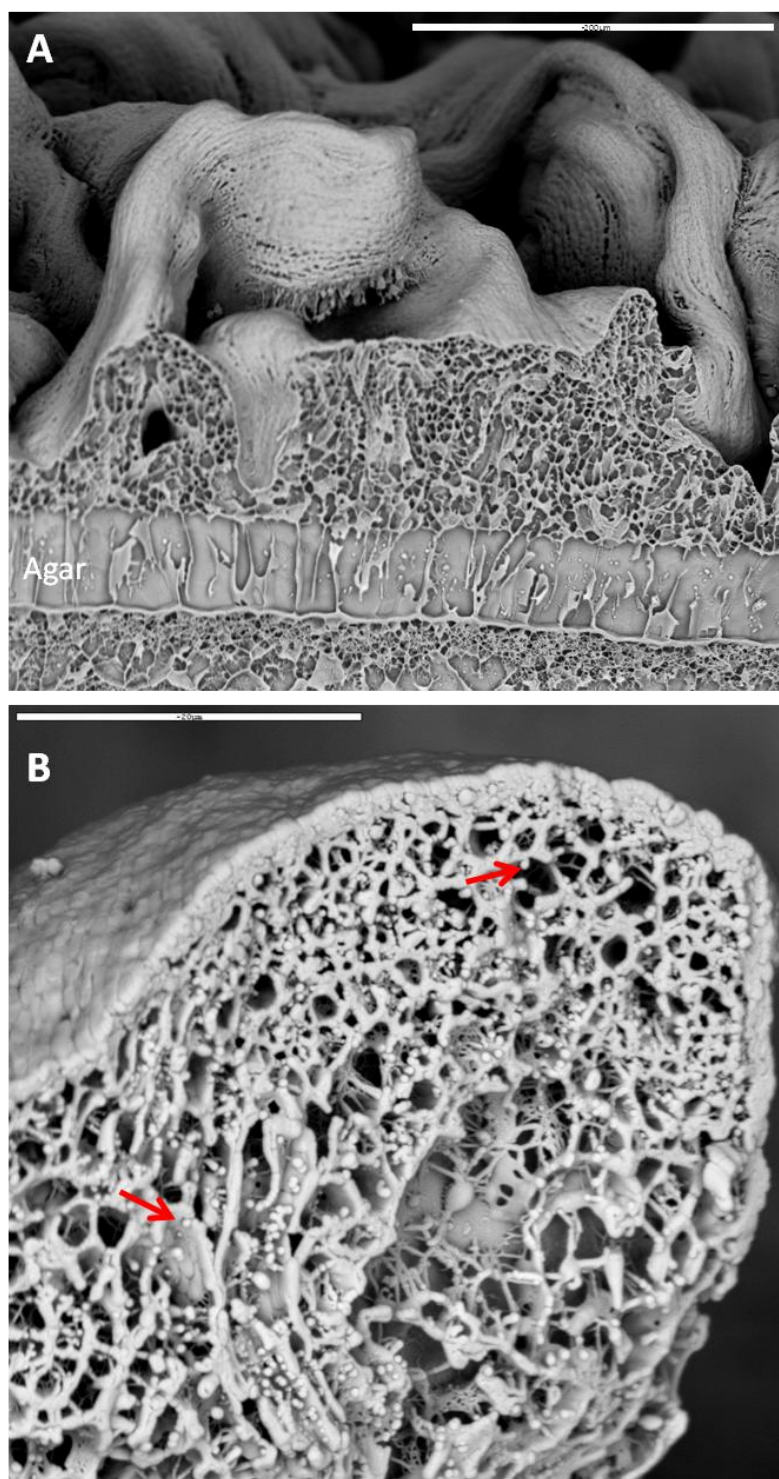
Para obtener imágenes de la organización celular en el interior de los cuerpos aéreos analizamos colonias de la estirpe 3610 mediante crio-fractura y microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LTSEM). Esta técnica permite congelar a muy baja temperatura la muestra en lugar de deshidratarla de tal forma que la organización celular se conserva prácticamente igual a la estructura *in vivo*. Mediante esta técnica se observaron distintas zonas de las colonias: la zona más joven con cuerpos aéreos incipientes (los cuerpos aéreos empiezan a formarse en el margen de la colonia), y la zona madura con cuerpos aéreos bien desarrollados.

Empleando microscopía óptica y LTSEM en esta zona, podemos observar la presencia de cadenas celulares que se empiezan a cohesionar, dejando espacios en los límites de la colonia (fig.30A y B) y más estrechamente conforme nos adentramos en la colonia (fig.30A y C). Se puede apreciar en detalle como en la región de formación de los cuerpos aéreos las cadenas de células empiezan a plegarse dando lugar a un pequeño cuerpo aéreo joven (fig.30C). Estos resultados apoyan los estudios realizados hasta la fecha en los cuales el modelo planteado para el desarrollo y maduración de los cuerpos aéreos consiste en la formación de cadenas de células que se van agregando y plegando.

En la fig.31A se muestra una imagen de la sección transversal de una colonia de *B. subtilis* 3610 tomada mediante crio fractura y LTSEM en una zona madura, con presencia de cuerpos aéreos bien formados, donde cabe destacar el elevado grado de organización que presenta. Mientras que la superficie está formada por varias capas de células alineadas y adheridas unas a otras, el interior parece tener una estructura porosa formada por numerosos espacios o cavidades (fig.31 y 32).



**Figura 30: Organización de la estructura de las comunidades multicelulares formadas por *B. subtilis* 3610.** A) Imagen de microscopía óptica (DIC) del margen de una colonia. En la parte izquierda se aprecian cadenas celulares sencillas mientras que a la derecha se observan los cuerpos aéreos en desarrollo (zonas oscuras de mayor densidad celular). La barra representa 200  $\mu\text{m}$ . B) Cadenas alineadas en el margen de la colonia; la barra representa 20  $\mu\text{m}$ . C) Cadenas celulares más cohesionadas que se pliegan dando lugar a un cuerpo aéreo joven; la barra representa 10  $\mu\text{m}$ . Las imágenes B y C fueron tomadas con microscopía LTSEM.



**Figura 31: Estructura interna de los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610.** A) Sección transversal de una colonia con cuerpos aéreos donde se puede apreciar una estructura interna porosa en contraste con las capas de células compactas y alineadas del exterior. Imagen tomada con Microscopía LTSEM. La barra representa 200 µm. B) Sección transversal de la parte apical de un cuerpo aéreo maduro en el que se aprecia la presencia de esporas (flechas rojas) en las cavidades de la estructura porosa. Imagen tomada con Microscopía LTSEM con criofractura. La barra representa 20 µm.

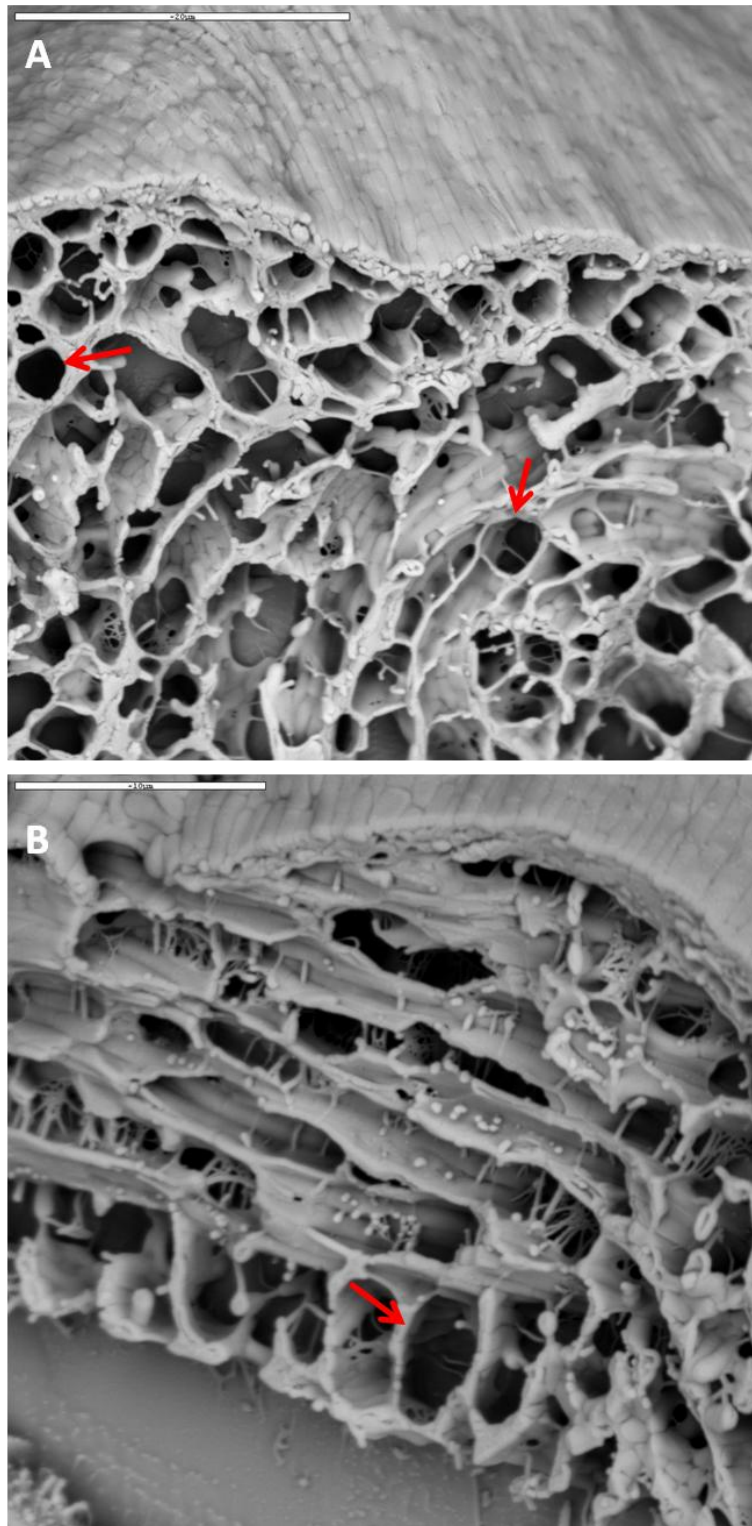
Al analizar una sección transversal de la zona apical de un cuerpo aéreo maduro (fig.31B) se observa la misma estructura porosa en el interior, separada del exterior por al menos dos capas de células adheridas entre sí. A su vez, en el interior finas capas de células separan los espacios huecos en los cuales se pueden apreciar unas células esféricas que se corresponden con las esporas (flechas rojas) producidas en los cuerpos aéreos, como se propuso previamente mediante el empleo de otra técnica (Branda *et al.*, 2001).

## **2.2 Las células en el interior de los cuerpos aéreos se organizan formando conductos**

Para analizar con más detalle las cavidades que constituyen la estructura porosa de los cuerpos aéreos de la estirpe 3610 de *B. subtilis*, se tomaron imágenes a mayor aumento de secciones transversales generadas por criofractura y observadas por LTSEM (fig.32). De nuevo se observa como la superficie exterior está formada por cadenas de células alineadas y cohesionadas, mientras que los espacios internos se corresponden en realidad con estructuras tubulares, semejantes a conductos, separados entre sí por paredes de monocapas celulares. Por lo tanto, el interior de los cuerpos aéreos está formado por una intrincada red de conductos cuya finalidad aún desconocemos.

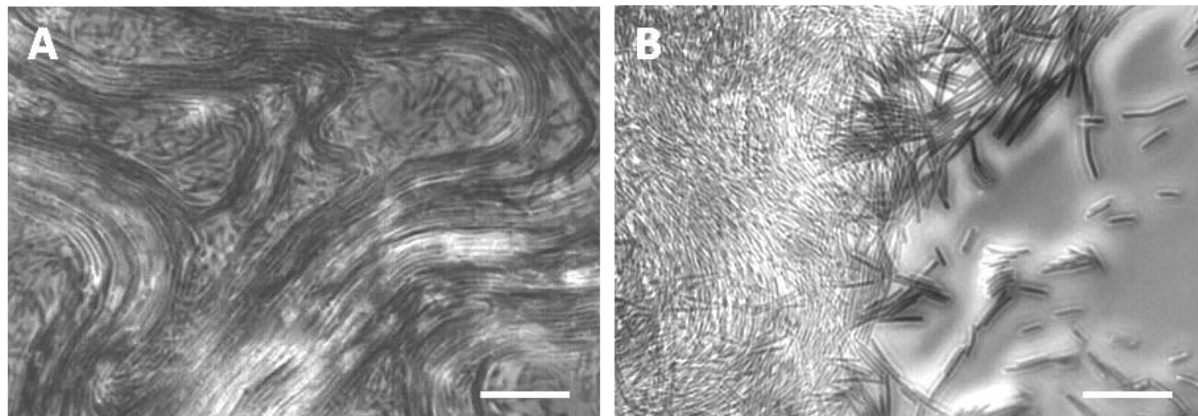
Para contrastar estos resultados, además de la estirpe silvestre 3610 también se analizaron las colonias de un mutante 3610 *yveQ::tet*, defectuoso en la formación de cuerpos aéreos. El gen *yveQ* es necesario para la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y los mutantes afectados en este gen generan colonias lisas, carentes de cuerpos aéreos. Las células de este mutante tienen la capacidad de formar cadenas pero éstas no se alinean ni adhieren correctamente entre sí (fig.33) (Branda *et al.*, 2001).





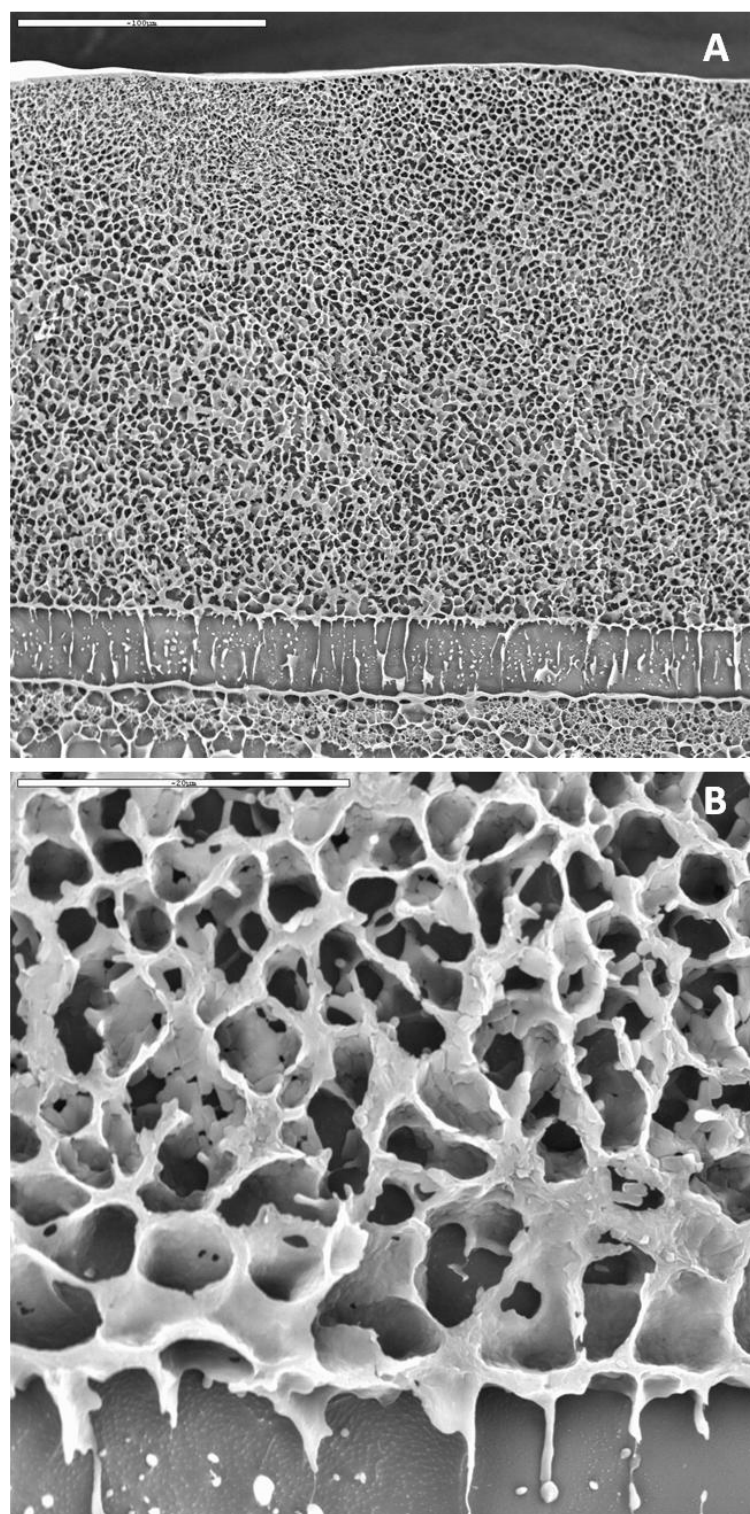
**Figura 32: Organización celular en forma de conductos en el interior de los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610.** A y B) Secciones transversales del cuerpo aéreo donde se aprecian los conductos (flechas rojas) delimitados por monocapas celulares. Imágenes tomadas con criofractura-LTSEM. Las barras representan 20 y





**Figura 33: Diferencias en la organización celular en el margen de la colonia en la estirpe silvestre 3610 (A) y en el mutante 3610 *yveQ::tet* (B).** Colonias crecidas en MSgg sólido, ON a 37°C y observadas mediante microscopía óptica con contraste de fases. La barra representa 10 μm.

Al observar las secciones de colonias del mutante *yveQ* con crio-fractura y microscopía LTSEM, se puede apreciar la ausencia de cuerpos aéreos pero la presencia de una estructura interna de aspecto poroso bajo la superficie (fig.34A). Al analizar la estructura a mayor aumento se puede observar como las cavidades no se corresponden con estructuras tubulares o conductos, a diferencia de lo que ocurre en el 3610, ya que las monocapas celulares que conforman las paredes no generan espacios estancos sino que quedan interconectados entre sí, de forma semejante a la estructura de una piedra pómez o una esponja (fig. 34B). Además se puede apreciar que las células no se organizan igual que en los conductos, es decir, no están alineadas, sino que se agrupan aleatoriamente. Por lo tanto podemos afirmar que el nivel de organización celular interno es de menor complejidad en las estirpes que no producen cuerpos aéreos en comparación con el de la estirpe silvestre 3610.

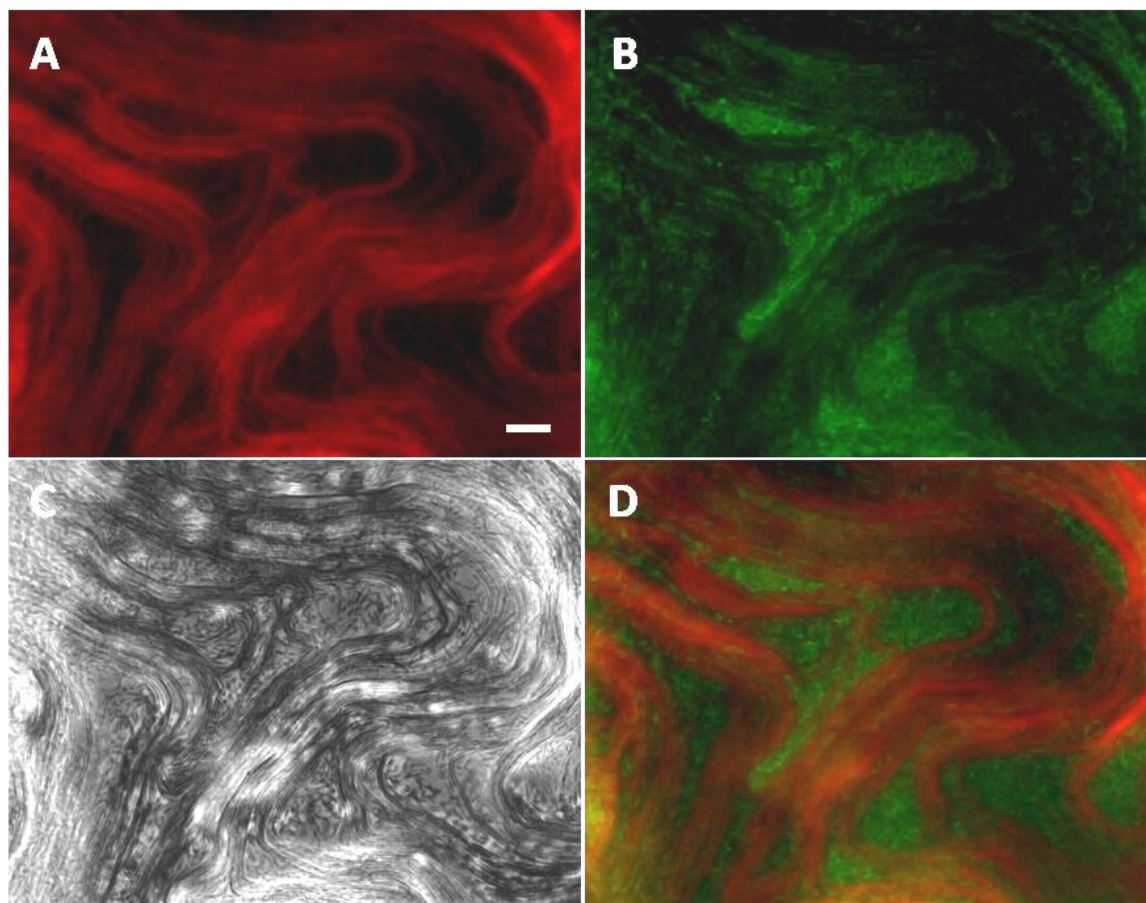


**Figura 34:** La complejidad en la organización celular interna del mutante *yveQ* es inferior a la de la estirpe silvestre 3610. A) Sección transversal de una colonia de 3610 *yveQ::tet*, mutante defectivo en la producción de cuerpos aéreos, donde se aprecia una estructura interna porosa. La barra representa 10 μm; B) detalle a mayor aumento de la imagen A. La barra representa 20 μm. Imágenes tomadas con criofractura LTSEM.

### **3. Localización de subpoblaciones celulares en los cuerpos aéreos de *B. subtilis*: las células con motilidad se distribuyen por el interior de los cuerpos aéreos**

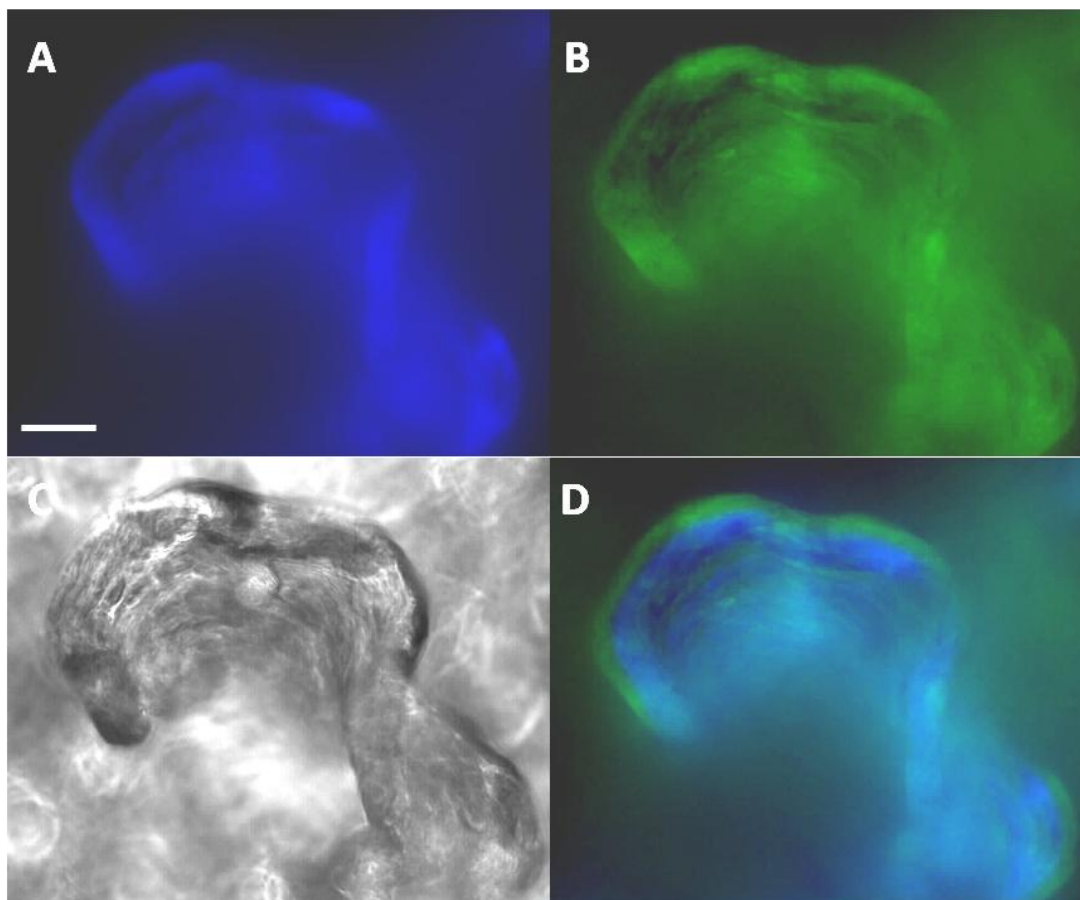
La observación del margen de la colonia mediante microscopia óptica reveló la presencia de células con motilidad atrapadas entre las cadenas celulares, y en el interior de los cuerpos aéreos (videos 1 y 2, CD Anexo III). Hasta el momento se pensaba que las células móviles se localizaban en la base de los cuerpos aéreos (Vlamakis *et al.*, 2008), es por ello que tras observar la presencia de conductos en el interior de estas estructuras y dada la relación existente entre la motilidad y la producción de eDNA (Capítulo 2 - Resultados) nos interesamos en analizar con mayor detalle la distribución de la subpoblación de células con motilidad en el interior de los cuerpos aéreos.

Con el fin de marcar y determinar la distribución de las células con motilidad realizamos una primera aproximación utilizando un marcaje fluorescente que nos permitía distinguir este tipo celular. Para ello, el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) se puso bajo el control del promotor del gen *hag* ( $P_{hag}$ -*gfp*). El gen *hag* codifica para la proteína flagelina que es la unidad estructural principal del filamento del flagelo bacteriano, de este modo las células que presenten motilidad emitirán fluorescencia verde. Se analizaron colonias de 3610  $P_{hag}$ -*gfp* crecidas en MSgg y marcadas con compuestos fluorescentes que se incorporan a todas las células: FM4.64, que se une a las membranas celulares y emite fluorescencia roja o DAPI, que se une a las moléculas de DNA y emite fluorescencia azul. Al examinar mediante microscopía de fluorescencia la zona de la colonia formada más recientemente en la que aun no se han formado cuerpos aéreos, observamos que las células con motilidad, que emiten fluorescencia verde, se encuentran atrapadas en los espacios que se forman entre las cadenas celulares, en este caso marcadas en rojo con FM4.64 (fig.35). Este resultado concuerda con el observado en el video 1 (CD Anexo III) en el que veíamos grupos de células individuales moverse entre los espacios generados por las largas cadenas de células sésiles y apoya la fiabilidad del marcaje de las células con motilidad con GFP. Por otra parte, al observar los cuerpos aéreos en detalle se puede apreciar una distribución muy característica de las células con motilidad que expresan GFP: se organizan en aparentes bandas o líneas paralelas que recorren longitudinalmente los cuerpos aéreos (fig. 36).



**Figura 35: Distribución de las células con motilidad en el margen de la colonia de *B. subtilis* 3610  $P_{hag}$ -gfp.** A) Imagen de las membranas celulares marcadas con FM4.64 (fluorescencia roja); B) Imagen de las células con motilidad, marcadas con GFP (fluorescencia verde); C) imagen con contraste de fase; D) composición de las figuras A y B, donde se observa como las células con motilidad se distribuyen en los espacios generados por las cadenas celulares. Colonia crecida en MSgg sólido, ON a 37°C. Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia. La barra representa 20  $\mu$ m.

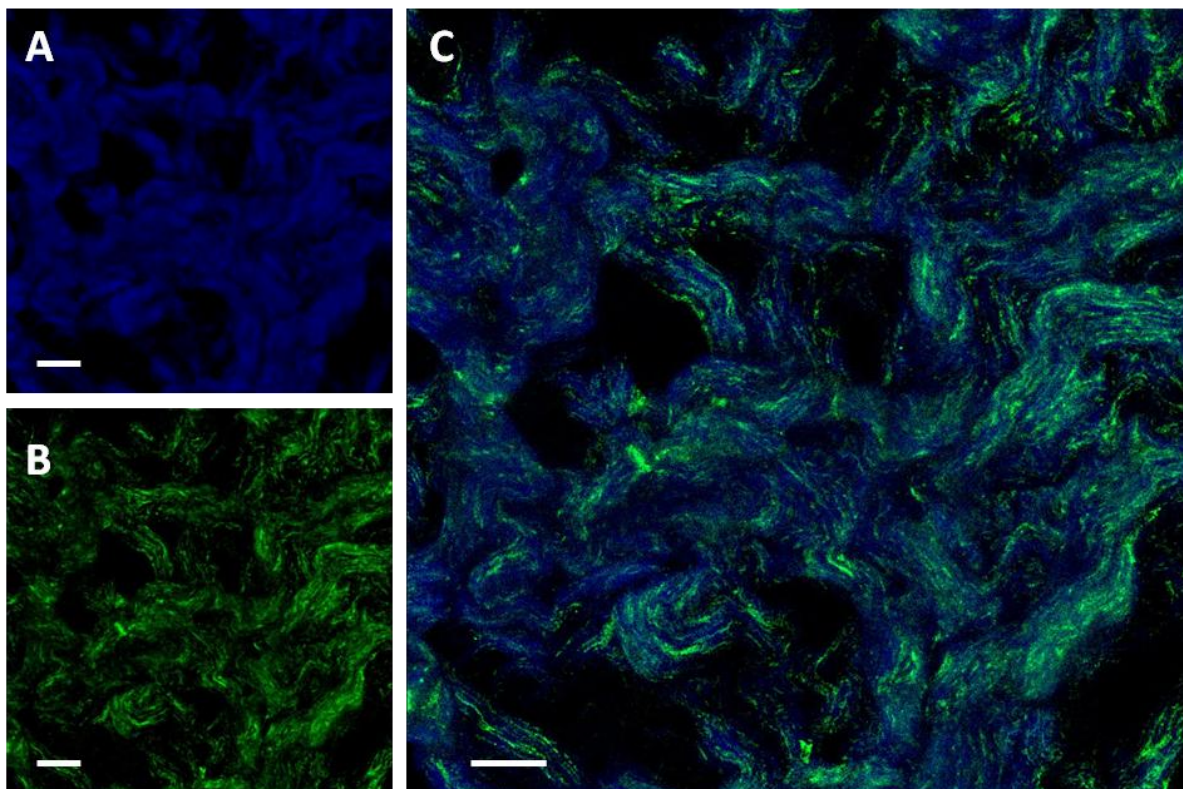
Con el fin de estudiar con mayor detalle la distribución espacial de las células móviles, decidimos utilizar microscopía confocal de fluorescencia. Para ello utilizamos muestras de colonias de *B. subtilis* 3610  $P_{hag}$ -gfp crecidas en MSgg sólido en las cuales se aplicaron marcajes fluorescentes de membrana (FM4.64) y de DNA (DAPI), como se ha descrito anteriormente. En la fig.37 se muestra la reconstrucción en 3D del *stack* de imágenes obtenidas de cuerpos aéreos formados por la estirpe 3610  $P_{hag}$ -gfp. Se puede observar claramente y con mayor definición cómo las células móviles se distribuyen formando líneas separadas entre sí, lo que sugiere que podrían estar moviéndose en el interior de conductos. Al observar con mayor detalle los cuerpos aéreos (fig.38) vemos como estas células alineadas se distribuyen paralelamente entre sí recorriendo toda la longitud del cuerpo aéreo.



**Figura 36: Las células con motilidad se localizan en el interior de los cuerpos aéreos de *B. subtilis*.** Imágenes de un cuerpo aéreo formado por la estirpe 3610 *P<sub>hag</sub>-gfp*: A) marcaje con DAPI del DNA de las células (fluorescencia azul); B) marcaje con GFP de las células móviles (fluorescencia verde) distribuidas por el cuerpo aéreo; C) imagen de contraste de fase; D) combinación de las imágenes A y B, en la que se aprecia la distribución en bandas o líneas de las células móviles por regiones concretas del cuerpo aéreo. Colonia crecida en MSgg sólido, ON a 37°C. Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia. La barra representa 10µm.

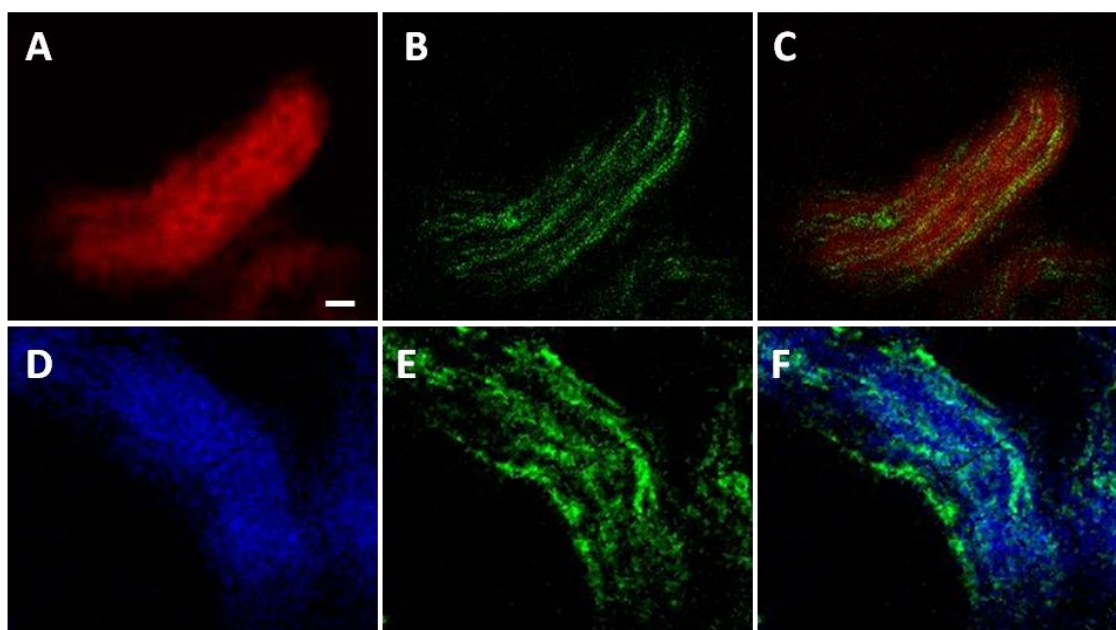
Para complementar estos resultados los cuerpos aéreos formados por la estirpe 3610 *P<sub>hag</sub>-gfp* se analizaron con un microscopio confocal de fluorescencia que permitía grabar vídeos del movimiento celular en el interior de los cuerpos aéreos (Laboratorio del Dr. Knut Drescher, Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology). En el video 3 (CD Anexo III), se puede ver en contraste de fase como grupos de células se desplazan a alta velocidad por zonas muy concretas. Es decir, de nuevo parece que las células con motilidad se mueven por lugares específicos en el interior de los cuerpos aéreos y no de forma aleatoria por la base como se pensaba hasta ahora, apoyando la idea de la presencia de células móviles en el interior de los conductos observados con LTSEM.





**Figura 37: Distribución espacial de las células motiles en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610  $P_{hag}$ -gfp.** A) marcaje con DAPI del DNA de todas las células (fluorescencia azul); B) marcaje con GFP de las células con motilidad (fluorescencia verde); C) combinación de las imágenes A y B, donde se aprecia una distribución de las células móviles en líneas definidas que recorren todos los cuerpos aéreos. Colonia crecida en MSgg sólido, ON a 37°C. *Stacks* de imágenes tomadas con Microscopía Confocal de Fluorescencia. La barra representa 200µm.

Por otra parte, pudimos comprobar que las células que se mueven tan activamente son en realidad las células que expresan la proteína GFP, como se puede ver el video 4 (CD Anexo III) en el que se observan sólo las células que emiten fluorescencia verde. Con esta técnica pudimos aumentar el detalle hasta visualizar células motiles individuales desplazándose en el interior de los cuerpos aéreos (video 4, CD Anexo III). En resumen, podemos confirmar que las células con motilidad se distribuyen y se mueven por conductos en el interior de los cuerpos aéreos, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia.



**Figura 38: Detalle de la distribución lineal de las células con motilidad en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610 *P<sub>hag</sub>-gfp*.** A) Marcaje de las membranas celulares con FM4.64 (fluorescencia roja); B y E) marcaje con GFP (fluorescencia verde) de las células motiles; C) combinación de las imágenes A y B; D) marcaje del DNA de las células con DAPI (fluorescencia azul); F) combinación de las imágenes D y E. Colonia crecida en MSgg sólido, ON a 37°C. Imágenes tomadas con Microscopía Confocal de Fluorescencia. La barra representa 20µm.

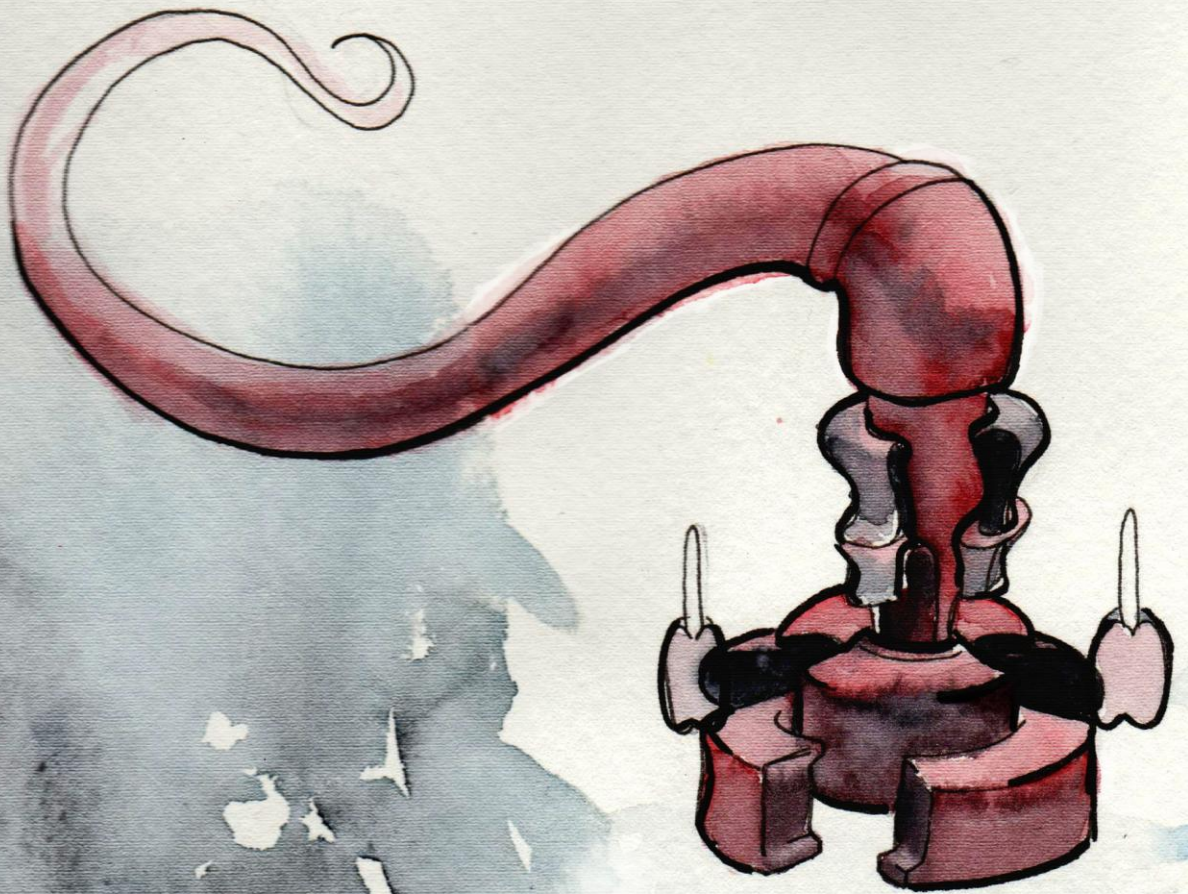
#### 4. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo muestran que, con las técnicas utilizadas, no ha sido posible detectar eDNA en los cuerpos aéreos de *B. subtilis*. Estos resultados apoyan los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en los que se descartaba que el eDNA tuviera un papel estructural en la formación de los cuerpos aéreos de *B. subtilis* y planteaban que tuviera un papel en la TGH. En cualquier caso, se necesitan más experimentos para aclarar este punto.

Al mismo tiempo se pudo demostrar la complejidad interna de los cuerpos aéreos donde se detectó la presencia de conductos de pequeño diámetro ausentes en los mutantes defectivos en la formación de cuerpos aéreos. El estudio del eDNA y de la estructura del cuerpo aéreo nos llevó a describir la presencia de células con motilidad distribuidas por regiones concretas del cuerpo aéreo, formando bandas paralelas. Dado que las células se desplazan activamente y considerando la presencia de los conductos microscópicos, planteamos que las células con motilidad se desplazan por el interior de dichos conductos.



# DISCUSIÓN





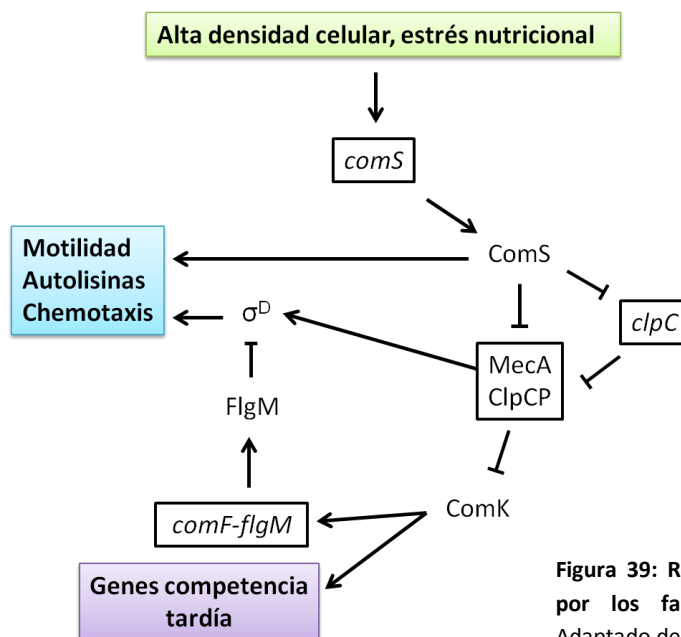
### 1. *ComS regula la producción de eDNA*

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que los genes de competencia temprana pero no los de competencia tardía estaban implicados en la producción de eDNA. Entre los genes de competencia temprana, se observó que un mutante afectado en el gen *srfAA*, implicado en la síntesis de surfactina, era defectivo en la producción de eDNA al mismo tiempo que se descartaba que la propia surfactina tuviera un papel en dicho proceso (Zafra *et al.*, 2012). El posible efecto polar de la mutación en *srfAA* en la transcripción de los siguientes genes del operón *srf* nos condujo a investigar el gen *comS*, que codifica para una proteína de 46 aminoácidos y que se ubica dentro del segundo gen del operón, *srfAB*, en otro marco de lectura (D'Souza *et al.*, 1994).

Para ello se analizó el efecto sobre la producción de eDNA de la sobreexpresión del gen *comS* y de su delección. Los resultados muestran que la sobreexpresión de *comS* conlleva la sobreproducción de eDNA en comparación a la estirpe silvestre, y que la delección del mismo provoca que la estirpe se vuelva defectiva en la producción de eDNA al mismo tiempo que afecta a la síntesis de surfactina. Así mismo, el defecto en la producción de eDNA de una mutación en el tercer gen del operón, *srfAC*, se pudo revertir parcialmente al introducir una copia de *comS* en *amyE*. Por otro lado, el estudio transcripcional mediante *microarrays* de la estirpe  $\Delta comS$  muestra la inhibición de numerosos genes relacionados con el metabolismo de los ácidos nucleicos y de replicación del DNA tales como la DNA polimerasa DnaE o la DNA girasa (*gyrB*), necesaria para el inicio de la replicación del DNA (Barnes *et al.*, 1998; Lanz *et al.*, 2014; Samadpour & Merrikh, 2018). Puesto que las células productoras de eDNA deben de replicar activamente su genoma completo para liberar grandes cantidades al medio extracelular (Zafra *et al.*, 2012), estos resultados concuerdan con la esperable inducción de genes relacionados con la replicación en los tiempos experimentales estudiados.

Hasta ahora la única función que se había descrito para ComS es la de activar indirectamente la transcripción de *comK*, liberándolo de la degradación por ClpC gracias a su interacción con MecA (D'Souza *et al.*, 1994, 1995; Hamoen *et al.*, 1995; Ogura *et al.*, 1999; Persuh *et al.*, 1999; Turgay *et al.*, 2001). Sin embargo, dada su estructura se ha planteado que ComS posea más funciones además de la interacción con MecA, puesto que inicialmente se describió como una potencial proteína de unión a DNA que presenta similitudes en el homeodominio con la clase POU de factores transcripcionales eucariotas (D'Souza *et al.*, 1994). En los resultados obtenidos mediante *microarrays* se pudo observar además que el gen *clpC* se haya inducido en ausencia de ComS. Se trata de una nueva interacción

según la cual ComS parece inhibir la expresión de *clpC*, redundando así en el efecto inductor indirecto que ejerce sobre *comK* (fig.39 y 41).



**Figura 39: Regulación de la motilidad por los factores de competencia.**  
Adaptado de Liu & Zuber, 1998.

Por otra parte, nuestros resultados indican que la correcta expresión del gen *comS* depende de la transcripción completa del operón *srf*, hipótesis que concuerda con la planteada anteriormente por D'Souza *et al.* 1994. Como se ha mencionado previamente, al tratar de complementar la mutación de *srfAC* mediante una copia de *comS* bajo el promotor natural  $P_{srf}$  en el locus *amyE*, tanto la competencia como la producción de eDNA se recuperaron tan sólo parcialmente. Se ha descrito que los genes *pnpA* e *yhbF* son necesarios para la regulación de la estabilidad del transcrito. PnpA promueve la transcripción de *srf* mientras que *yhbF* es necesario para producir cantidades suficientes de ComS (Hamoen *et al.*, 2003). Curiosamente ambos genes se hayan inhibidos en un mutante  $\Delta comS$ , aunque *yhbF* lo está en menor medida ya que tiene una diferencia de expresión inferior a -1.8 veces. Teniendo en cuenta la complejidad y extensión del operón de la surfactina, es posible que el operón deba transcribirse al completo para posteriormente ser susceptible de sufrir procesos de procesamiento post-transcripcional del mRNA (Cosmina *et al.*, 1993; D'Souza *et al.*, 1994; Hamoen *et al.*, 2003). Este tipo de procesos han sido descritos en diversas bacterias, como en el caso del gen de la flagelina en las especies termófilas de *Bacillus* (Lehmann & Schmidt, 2003; Hayakawa & Ishizuka, 2012).

Por otro lado, al sobreexpresar *comS* introduciendo una copia del gen en el locus *amyE* bajo la regulación del promotor  $P_{spank}$ , inducible por IPTG, vimos que no hacía falta añadir IPTG en el cultivo para observar un incremento en la producción de eDNA o de la competencia, al mismo tiempo que añadir IPTG afectaba negativamente al desarrollo de la competencia y no alteraba el patrón de producción de eDNA frente a no añadirlo. Estos resultados muestran dos efectos generados por el IPTG:

1) En ausencia de IPTG debe de existir una transcripción basal del promotor  $P_{spank}$ . De este modo, pequeñas variaciones en la concentración citoplasmática de ComS afectarían tanto a la producción de eDNA como al desarrollo de la competencia. Esto puede deberse a que estos procesos se activen más en las poblaciones de células donde tienen lugar, o bien a que se incremente el número de células productoras de eDNA o competentes. Es importante recordar que sólo una subpoblación minoritaria de células desarrolla competencia y/o producción de eDNA (Hamoen *et al.*, 2003 ; Zafra *et al.*, 2012), y que la expresión de *comS* bajo el control del promotor  $P_{spank}$  tendría lugar en todas las células de la población.

2) La adición de IPTG disminuye significativamente la competencia. Se ha descrito con anterioridad que el IPTG puede resultar tóxico para las células (Kosinski *et al.*, 1992) sin embargo de ser así se esperaría que afectara negativamente a la producción de eDNA, lo cual no ocurre. Esta interpretación concuerda además con el hecho de que, como se observa en la fig.13B del capítulo 1, la inhibición de la competencia en presencia de IPTG es superior en la estirpe que sobreexpresa *comS* frente al 3610, diferencia que no se esperaría que ocurriera si el efecto del IPTG fuera meramente tóxico. Por lo tanto, es posible que el efecto observado se deba a que una elevada concentración de ComS favorezca la producción de eDNA frente al desarrollo de la competencia. Este tipo de regulación dependiente de concentración se ha descrito en diversas moléculas de *B. subtilis*. Por ejemplo, el péptido de *quorum sensing* CSF a bajas concentraciones activa a ComA mientras que altas concentraciones lo inhibe; o el caso de DegU el cual activa gradualmente diversas funciones conforme su fosforilación y su concentración intracelular varían (Hamoen *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007; Verhamme *et al.*, 2007). En este sentido, es posible que hasta cierto umbral de concentración ComS induzca la competencia y que por encima de dicho umbral la inhiba favoreciendo la producción de eDNA, lo cual concuerda además con el desarrollo temporal de ambos procesos ya que primero se desarrolla la competencia alcanzando el máximo a las 5:30 h de cultivo,

seguido de la producción de eDNA cuyo máximo se alcanza a las 6 h (en MSgg) (Lampretch-Grandío, 2012).

Por otra parte, observamos que en el mutante  $\Delta comS$  los genes *srfAC* y *srfAD* aparecen inhibidos frente al 3610. Estos resultados pueden deberse a la alteración en la región de *comS* (sustituida por un gen de resistencia a espectinomicina cuya secuencia es considerablemente más larga que la de *comS*), que podría provocar que la transcripción se detenga al llegar a este punto afectando así a *srfAC* y *AD*. Además también aparecen inhibidos los genes *srfAA* y *srfAB* aunque en menor medida (la diferencia de expresión en ambos casos es de -1.4 veces). De este modo, es posible que al incorporar la secuencia del gen de resistencia, el mRNA del operón *srf* sea menos estable degradándose con mayor facilidad, o bien que exista una posible regulación de ComS sobre la transcripción del operón *srf*. Esta posibilidad implicaría la presencia de un bucle de retroalimentación positiva en la cual *comS* incrementa su propia síntesis. Este tipo de mecanismo ha sido descrito en diversos genes reguladores tales como *comK*, *degU* o *sigD*, y en el caso de *comS* podría estar mediado por *pnpA* (Márquez-Magaña & Chamberlin, 1994; Smits *et al.*, 2005; Ogura *et al.*, 2014). Esta hipótesis se apoya además por la inducción observada del gen *rapD* en los *microarrays* del mutante  $\Delta comS$ . Se ha descrito que RapD inhibe la transcripción del operón *srf* actuando sobre ComA~P (Ogura & Yasutaro, 2007). De este modo ComS podría activar su propia síntesis de forma indirecta a través de la inhibición de *rapD*. Finalmente, otro factor que apoya esta hipótesis es la inhibición del gen que codifica OppF, una subunidad ATPasa que forma parte de la oligopéptido permeasa Opp (Rudner *et al.*, 1991; Berntsson *et al.*, 2009) en el perfil transcripcional del mutante  $\Delta comS$ . Mutantes en los genes *oppA* y *oppF* son defectivos en la producción de eDNA (Zafra *et al.*, 2012). Opp forma parte del sistema de QS que activa la transcripción del operón *srf*, por lo tanto, estos resultados indican que ComS podría inducir la transcripción de *oppF* y con ello la transcripción del operón *srf* (Lazazzera *et al.*, 1997; Hamoen *et al.*, 2003). La existencia de este bucle sería además consistente con la complejidad intrínseca a la regulación de los procesos de diferenciación celular. Por otro lado, el hecho de que *comS* active su propia síntesis podría así mismo explicar porqué no se consiguió complementar el fenotipo  $\Delta comS$  con una copia extra de *comS* en *amyE* bajo el promotor  $P_{srf}$ , puesto que éste podría estar reprimido.

## 2. ComS: molécula reguladora implicada en múltiples procesos

### 2.1 Regulación de la motilidad

Sorprendentemente un gran número de genes relacionados con la motilidad y quimiotaxis y pertenecientes al operón *fla/che* se encuentran inhibidos en el mutante  $\Delta comS$ , entre ellos el factor de transcripción *sigD* el cual, como se ha descrito anteriormente, es el factor de transcripción responsable de inducir la transcripción de la mayoría de los genes de motilidad (Márquez-Magaña & Chamberlin, 1994).

Hasta el momento se ha descrito que ComK inhibe a  $\sigma^D$  mediante la inducción del factor anti-sigma FlgM, y que MecA induce la motilidad activando la expresión de *sigD* (fig.39) (Caramori *et al.*, 1996; Liu & Zuber, 1998). Por lo tanto, sabiendo que ComS induce la expresión de *comK* inhibiendo la actividad de MecA, los resultados del estudio transcripcional indican que ComS induce la motilidad de forma independiente a la vía de competencia tardía (fig.39 y 41). De tal forma que ComS estaría ejerciendo una doble regulación sobre la motilidad: induciéndola en las células que no desarrollan competencia e inhibiéndola en las que sí.

Al analizar la motilidad de los mutantes *srfAC* y  $\Delta comS$  observamos que poseen *swimming* pero no *swarming*. Así mismo, conforme a los resultados descritos en el capítulo de motilidad, los mutantes en QS poseen tanto *swimming* como *swarming* (tabla 8). Por lo tanto, los genes de competencia temprana y QS no afectan a la motilidad tipo *swimming*. En lo que respecta al *swarming*, en un primer momento se interpretó que la falta de *swarming* era debida a la falta de surfactina (Kearns & Losick, 2003). Sin embargo, según nuestros resultados, el doble mutante  $\Delta oppA comP$  que no produce surfactina si que presenta *swarming* (tabla 8). Este resultado implica que la surfactina no es necesaria para el *swarming* en medio LB lo cual concuerda con los resultados de Julkowaska *et al.* 2005, donde plantean que el *swarming* varía en función de la composición del medio. Por lo tanto, los resultados indican que existe algún mecanismo no dependiente de la surfactina que afecta al desarrollo del *swarming* en los mutantes estudiados. Es posible que el *swarming* observado en el doble mutante  $\Delta oppA comP$  se deba a la existencia de una expresión basal de *comS*, suficiente como para activar dicho movimiento.

Tabla 8: Relación entre producción de surfactina y motilidad tipo swarming en distintos mutantes

Estirpe	Surfactina	Swarming
<i>ΔoppA comP</i>	No	Sí
<i>ΔcomS</i>	No	No
<i>srfAC</i>	No	No

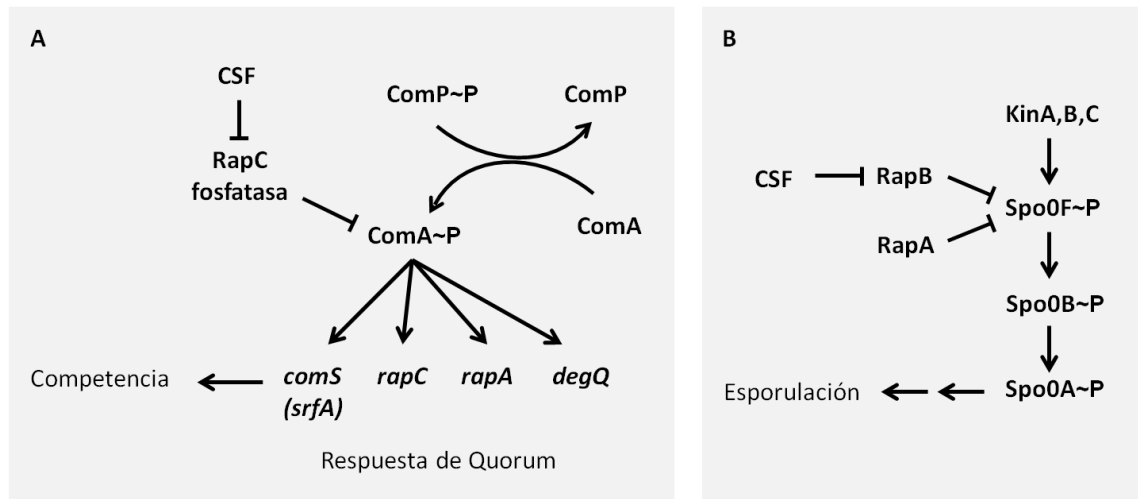
## 2.2 La regulación de *comS* afecta a diversos procesos de diferenciación celular

Los resultados del análisis del perfil transcripcional del mutante *ΔcomS* muestran como la expresión de genes relacionados con procesos de diferenciación celular característicos de fase estacionaria se hayan inducidos. Es el caso del gen *sipW*, el cual forma parte del operón *tapA-sipW-tasA* y está implicado en la producción de matriz extracelular además de afectar a la expresión del operón *epsA-O*, responsable a su vez de sintetizar glicosiltransferasas para la matriz extracelular y de inhibir la rotación del flagelo mediante EpsE (Blair *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2008; Cairns *et al.*, 2014).

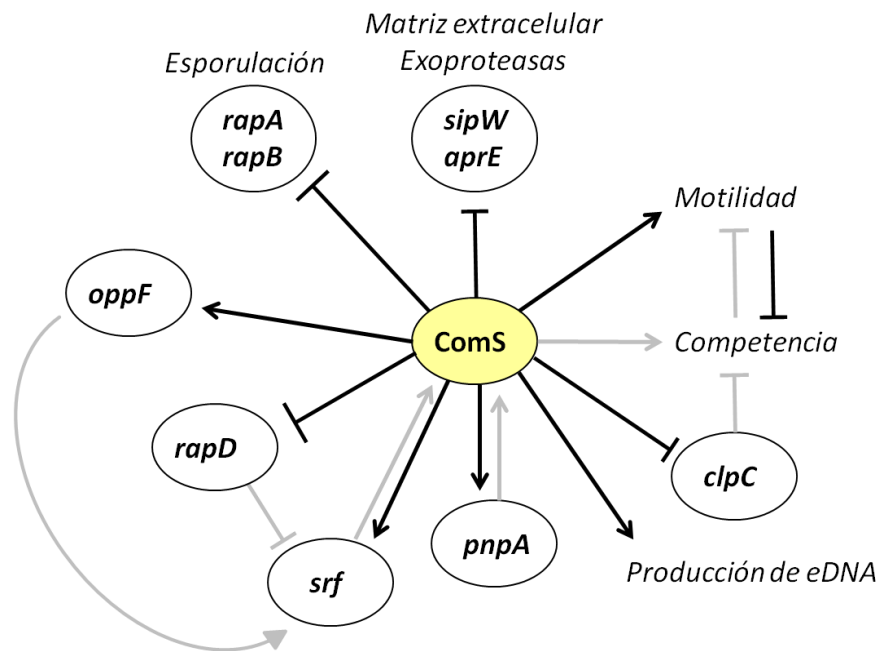
Aparece así mismo bajo la regulación de *comS* el gen *aprE*, el cual codifica para la exoproteasa subtilisina y cuya expresión se haya también regulada por AbrB, Spo0A, DegU, PhrG, SinR y ScoC (Olmos *et al.*, 1996; Ogura *et al.*, 2003; Shafikhani *et al.*, 2004).

Además de inhibir genes de producción de matriz extracelular y exoproteasas, ComS parece inhibir la esporulación a través de la activación de los genes *rapA* y *rapB*. *B. subtilis* codifica para 11 proteínas Rap, las cuales son proteínas reguladoras generalmente inhibidoras de diversos factores de regulación tales como Spo0A, ComA o DegU (Lazazzera & Grossman, 1998; Ogura & Fujita, 2007). Tanto RapA (cuya expresión es inducida por ComA~P) como RapB inhiben al factor de transcripción Spo0A~P y con ello la esporulación (fig.40).

Todos los nuevos efectos de ComS sobre genes y procesos celulares descritos en este trabajo se recogen en la figura 41.



**Figura 40: Regulación de las proteínas Rap.** A) Regulación de la competencia por las proteínas Rap; B) regulación de la esporulación por las proteínas Rap. Las flechas indican inducción y las T inhibición. Adaptado de Lazazzera & Grossman, 1998.



**Figura 41: Procesos celulares y genes afectados por ComS.** En gris aparecen las interacciones que ya han sido descritas con anterioridad y en negro las nuevas descritas en este trabajo. Las flechas indican inducción y las T indican inhibición.

En conjunto, los resultados muestran como ComS es una proteína reguladora implicada en numerosos procesos y que por tanto juega un papel más importante en la señalización y

diferenciación celular de lo que se había considerado hasta ahora. En concreto, además de ser necesario para el desarrollo de la competencia, ComS es relevante en la producción de eDNA. Como hemos demostrado en este trabajo, ComS afecta a la replicación del DNA así como a la motilidad, la cual a su vez es necesaria para la producción del eDNA.

### **3. La motilidad es necesaria para la producción de eDNA**

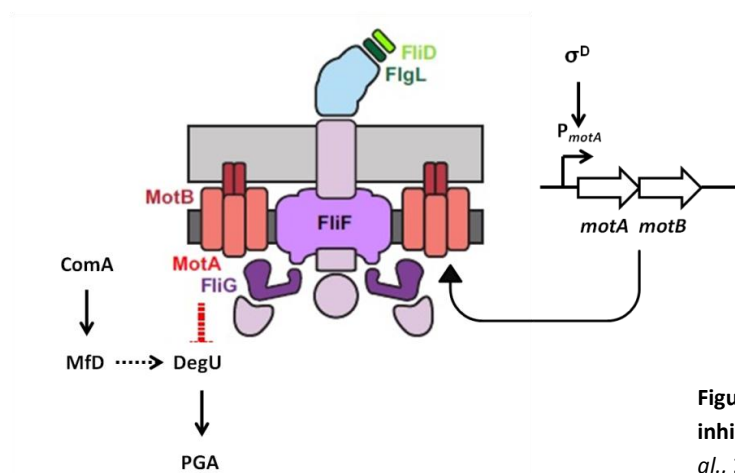
A partir de resultados anteriores obtenidos en nuestro laboratorio, según los cuales algunos genes de motilidad estaban implicados en la producción de eDNA, nos propusimos investigar la relación entre el desarrollo de la motilidad y la síntesis y liberación del eDNA. Para ello analizamos mutantes en los genes de motilidad: *hag*, *motAB* y *swrA*. Los resultados obtenidos muestran como los tres mutantes, afectados en diferentes partes del desarrollo del flagelo, carecen tanto de producción de eDNA, cuantificado en el sobrenadante de los cultivos, como de síntesis de eDNA, al no mostrar células con elevada intensidad de DAPI (EID) correspondientes a las células que activamente replican el DNA.

La estirpe mutante 3610 *hag::erm* carece de flagelos y no presenta motilidad *swimming* ni *swarming*. Al igual que el resto de elementos del flagelo, *hag* se encuentra regulado por varios factores y su promotor se halla bajo la regulación del factor de transcripción  $\sigma^D$  (Mirel & Chamberlin, 1989; Barrilla *et al.*, 1994; Guttenplan *et al.*, 2013).

El segundo mutante que comprobamos está afectado en los genes *motA* y *motB*, que codifican dos proteínas transmembrana necesarias para la rotación del flagelo, y cuya transcripción depende de  $\sigma^D$  (Blair & Berg, 1988; Kojima *et al.*, 2009). Estas proteínas conforman los llamados “stators”, cada uno de los cuales se compone de dos proteínas MotB y cuatro MotA. Para que la rotación flagelar se produzca, la energía de la fuerza protón motriz se transmite a través de MotB hacia MotA, la cual sufre un cambio conformacional e interacciona con FliG, generando así la fuerza mecánica necesaria (Chan *et al.*, 2014). El mutante 3610 *motAB::tet* tiene por tanto la capacidad de formar un flagelo completo pero no funcional (Rösch *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2014). Asimismo presenta una morfología mucosa debido a la acumulación intracelular de poli- $\gamma$ -glutamato (PGA), un homopolímero de glutamato que en el 3610 es secretado al medio extracelular. La sobreexpresión de PGA es inducida por el aumento en la concentración de DegU y por regulación indirecta a través de *mfd* (fig.42) (Chan *et al.*, 2014), un gen implicado en la reparación del DNA (Zalieckas *et al.*, 1998). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, donde al analizar el perfil



transcripcional mediante *microarray* del mutante *motAB* (Anexo II), diversos genes implicados en la síntesis de PGA (*capABC*) aparecen inducidos, especialmente a las 6 h de cultivo. Cabe destacar que el gen *mfd*, regulado por ComA (Ogura *et al.*, 2001), ha sido relacionado con la producción de eDNA en trabajos anteriores (Zafra *et al.*, 2012), lo cual concuerda con nuestros resultados en los que *mfd* se encuentra inhibido en el mutante  $\Delta comS$ . En los resultados de *microarray* de los mutantes *motAB*, se observa además como casi no hay genes inhibidos que estén relacionados con la motilidad, lo que confirma que el mutante *motAB* desarrolla flagelos completos, aunque éstos no sean funcionales.

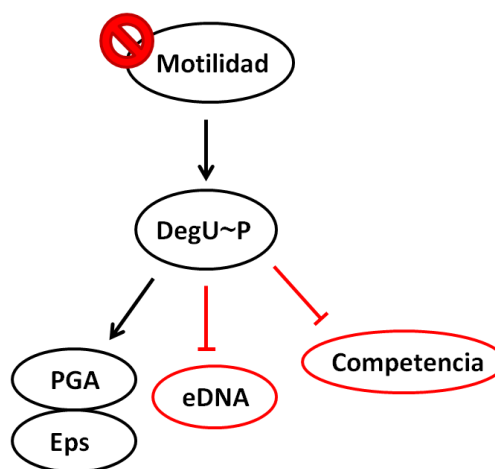


**Figura 42: Las proteínas transmembrana MotA y B inhiben la síntesis de PGA.** Adaptado de Chan *et al.*, 2014.

Dado que los mutantes *motAB* no producen eDNA, se demuestra que al afectar la capacidad de rotación del flagelo se inhibe la producción de eDNA en *B. subtilis* 3610. La relación entre ambos procesos podría ser indirecta o directa. En el primer caso, se ha demostrado que el flagelo, además de servir para el movimiento, actúa como un mecanorreceptor (Cairns *et al.*, 2013). De este modo, la resistencia generada por el contacto con la superficie provoca la inhibición de *motB* causando el incremento en la transcripción de DegU y con ello la activación de los procesos derivados de DegU~P como son la producción de exoproteasas o de PGA entre otros (Cairns *et al.*, 2013). Puesto que un mutante en *degU* tampoco puede producir eDNA (Zafra *et al.*, 2012) es posible que el mutante *motAB* inhiba la producción de eDNA a través de la acumulación intracelular de DegU~P (fig.43). De hecho, otros genes regulados por DegU~P como los genes que codifican para el Sistema de Secreción East-6-like (ESX) (Baptista *et al.*, 2013) aparecen inducidos en los *microarrays* de los mutantes en motilidad.

Por otro lado, la relación entre la producción de eDNA y la rotación del flagelo podría ser directa, en caso de que el flagelo tuviera una función activa en la exportación del eDNA, hipótesis que se discutirá más adelante. De ser así, la ausencia de acumulación intracelular de DNA en los mutantes en motilidad se podría explicar por el hecho de que la célula sea capaz de detectar que tiene afectado el flagelo y que por tanto, mediante un sistema de retroalimentación negativa, se inhiba el proceso de síntesis de DNA para evitar el gasto energético y su acumulación en el interior celular que podría resultar tóxica.

**Figura 43: La inhibición de la rotación del flagelo inhibe la producción de eDNA y la competencia.** Las flechas negras indican inducción mientras que las **T** indican inhibición. Eps = Exoproteasas.



El tercer gen que se investigó fue *swrA*, que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la motilidad y del movimiento tipo *swarming* (Kearns & Losick, 2003). El gen *swrA* forma parte de un operón dicistrónico que se encuentra bajo la regulación de dos promotores: uno dependiente de  $\sigma^D$  (activo durante el crecimiento planctónico) y otro dependiente de la RNA polimerasa-sigma A ( $\sigma^A$ ), que sería a su vez activado por DegU~P (Calvio *et al.*, 2005, 2008). Una vez expresado, SwrA promueve la transcripción del operón *fla/che* mediante su interacción con DegU~P sobre el promotor  $P_{fla/che}$  (Kearns & Losick, 2005; Calvio *et al.*, 2008; Ghelardi *et al.*, 2012; Mordini *et al.*, 2013). De hecho, SwrA parece actuar en conjunción con DegU~P modulando su actividad sobre el promotor, de tal forma que en ausencia de SwrA, DegU~P inhibe al promotor mientras que en presencia de SwrA lo activa (Mordini *et al.*, 2013). De este modo SwrA podría así mismo actuar modulando la actividad de DegU~P en otros genes, como por ejemplo en el caso del gen *ycaA* (Ogura & Tsukahara, 2012). En conjunto, SwrA es considerado el modulador del mecanismo de variación de

fase ON/OFF que garantiza la diversidad en la población en cuanto a motilidad. Se ha descrito además que SwrA regula el número de cuerpos basales (Guttenplan *et al.*, 2013).

Los mutantes en *swrA*, pierden la capacidad de motilidad tipo *swarming* pero no pierden la motilidad tipo *swimming* del todo, ya que el promotor  $P_D$  (activado por  $\sigma^D$ ) del operón *fla/che* juega un papel fundamental generando un bucle de activación que permite mantener la motilidad basal cuando *swrA* está inhibido. Estos datos concuerdan con los resultados del perfil transcripcional del mutante en *swrA* dónde se puede observar que prácticamente todos los genes implicados en la motilidad y quimiotaxis están parcialmente inhibidos entre 2-3 veces en comparación al 3610. Así mismo, aparecen inducidos genes relacionados con la producción de PGA, resultados descritos anteriormente por Osera *et al.*, 2009. Por lo tanto, conforme a estos resultados, la producción de eDNA depende, no sólo del desarrollo de flagelos funcionales, sino que también depende de *swrA*.

Tanto *hag*, como *motAB* o *swrA* se encuentran bajo la regulación de  $\sigma^D$  (Mirel & Chamberlin, 1989; Calvio *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2014). De hecho,  $\sigma^D$  regula a la gran mayoría de genes relacionados con la motilidad, teniendo a su vez intensamente regulada tanto su expresión como su actividad (Mukherjee *et al.*, 2014). Por un lado, su actividad se ve potenciada por SwrB, proteína codificada por el último gen del operón *fla/che* ubicado justo a continuación de *sigD*, y por otra parte es inhibida por el factor anti-sigma FlgM (Caramori *et al.*, 1996). Cuando se alcanza la concentración necesaria de  $\sigma^D$  gracias a la compleción del cuerpo basal y del *hook*, y a la activación por SwrA-DegU~P de la transcripción completa del operón *fla/che*, los genes regulados por  $\sigma^D$  ubicados fuera del operón empezarán a expresarse (Mukherjee *et al.*, 2014). Es el caso de *motAB*, como mencionábamos anteriormente, pero también el de los genes que codifican para las autolisinas. Los genes de autolisinas regulados por  $\sigma^D$  son: *lytABC*; *lytD* y *lytF* (Lazarevic *et al.*, 1992; Rashid *et al.*, 1995; Margot *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008). Mientras que la actividad de *lytC* depende también en un 20% de  $\sigma^A$ , el resto se encuentran regulados exclusivamente por  $\sigma^D$  (Smith, 2000). Las autolisinas están implicadas en la remodelación de la pared celular permitiendo a las células con motilidad mantenerse como células individuales (Blackman *et al.*, 1998). Anteriormente en nuestro laboratorio, se descartó que el triple mutante *lytABC* tuviera afectada la producción de eDNA (Zafra *et al.*, 2012). Sin embargo, quedó por caracterizar el resto de autolisinas reguladas por  $\sigma^D$ . Al analizar la producción de eDNA en los mutantes *lytC*, *lytD*, *lytF* y el triple mutante *lytCDF*, se pudo observar que tan sólo el mutante *lytD* y el triple mutante *lytCDF* tienen afectada la producción de eDNA.

Curiosamente, este resultado apoya los resultados obtenidos en el análisis transcripcional del mutante *swrA* y del mutante  $\Delta comS$  donde aparece *lytD* inhibido. Es interesante destacar que los mutantes de genes de autolisinas de forma individual mantienen un fenotipo y motilidad semejante al 3610, sin embargo, los mutantes que tienen afectados varios genes de autolisinas simultáneamente sí que presentan alteraciones, como el crecimiento exclusivo en forma de cadenas y la ausencia de motilidad. Es por ello que se considera que las autolisinas actúan de forma cooperativa y con funciones intercambiables (Lazaravic *et al.*, 1992; Margot & Karamata, 1992; Margot *et al.*, 1994; Margot *et al.*, 1999). La única autolisina para la que se ha descrito un efecto sobre el *swarming* es precisamente LytD (Margot *et al.*, 1994).

LytD (endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa) se sintetiza durante la fase exponencial del crecimiento (Rashid *et al.*, 1995) y actualmente se desconoce su función exacta ya que los resultados obtenidos hasta la fecha son controvertidos (Margot *et al.*, 1994; Smith, 2000). Una posible explicación para la implicación de LytD en la producción de eDNA, ya que se descartó que la liberación del eDNA se produjera por lisis celular (Zafra *et al.*, 2012), podría ser que sea una de las primeras autolisinas en expresarse y que lo haga en mayor cantidad que el resto porque  $\sigma^D$  presente una mayor afinidad por el promotor de *lytD*. De ser así, al inhibirse la motilidad y con ello la expresión de *sigD*, la expresión de *lytD* en relación a la estirpe silvestre estaría más afectada. Sin embargo, no se puede descartar que LytD tenga también la capacidad de desempeñar una función señalizadora (Chen *et al.*, 2008). Dado que un mutante *lytD* está parcialmente afectado en motilidad tipo *swarming*, también es posible que la inhibición en la producción del eDNA se deba a un efecto indirecto derivado de la inhibición de la motilidad, la cual, como hemos descrito anteriormente, sería interpretada por la célula como una señal para no emplear recursos en la producción del eDNA.

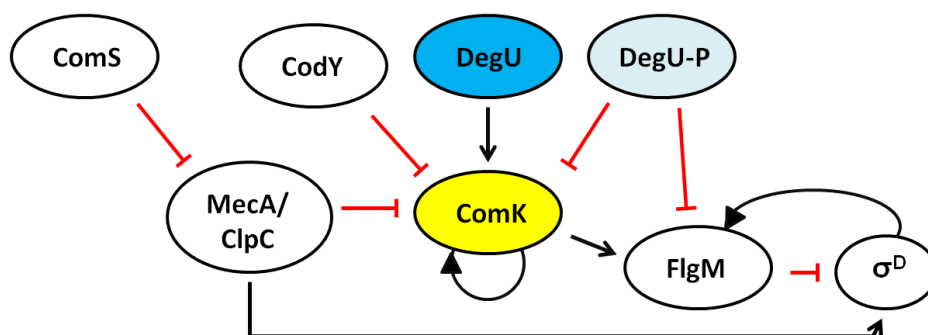
Finalmente, analizando los perfiles transcripcionales de los mutantes *motAB* y *swrA* pudimos observar que también aparecen afectados un gran número de genes relacionados con profagos (PBSX y SP $\beta$ 2). A pesar de que se describió la existencia de una relación entre la producción de DNA y del profago PBSX (Shingaki *et al.*, 2003), en el trabajo de Zafra *et al.* 2012 se demostró que un mutante *xdkG* no afectaba a la producción de eDNA en la estirpe 3610, por lo que se descartó su implicación en el proceso.

Por otra parte, se estudió la posibilidad de que los mutantes de motilidad estuvieran afectando a la ruta de competencia temprana y que eso pudiese explicar el defecto en producción de eDNA. Nuestros resultados en las pruebas de producción de surfactina en medio sólido DSM mostraron que los mutantes en motilidad expresan el operón *srf* correctamente. Además, mediante análisis cuantitativo de la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa producida a partir del  $P_{srf}$ -*lacZ* en los mutantes de motilidad, se observó un incremento en la actividad del promotor  $P_{srf}$ . Como se mencionó anteriormente, la transcripción del operón *srf* depende de la actividad de ComA, por lo que los mutantes en motilidad presentarían mayor actividad de ComA. Esto además se verificó con los resultados de transcripción diferencial de los mutantes en motilidad, por la inducción de genes regulados por ComA como *pel* (Ogura *et al.*, 2001) o *srfAB*. Dado que ComA indirectamente activa la expresión de *degQ*, el cual codifica para la kinasa responsable de la fosforilación de DegU, la expresión de ComA estaría también contribuyendo al incremento intracelular en la concentración de DegU~P.

En conjunto, los resultados muestran como la motilidad afecta a la producción de eDNA de forma independiente a la ruta de competencia temprana. En este sentido, planteamos que la función del flagelo esté relacionada con dos vías complementarias entre sí: i) una vía de señalización implicada en la síntesis de eDNA mediada por DegU, y ii) una relación directa a través de la cual la estructura flagelar sería empleada para exportar el DNA al medio extracelular.

#### **4. Motilidad y competencia: dos procesos excluyentes pero interdependientes**

El desarrollo de la competencia es un proceso que, al igual que la motilidad, se produce de forma heterogénea en la población (Dubnau, 1999; Avery, 2005). Como se comentó anteriormente, además de estar regulado por ComS, la expresión de *comK* es inducida por DegU -sin fosforilar- (Hamoen *et al.*, 2000) y por el propio ComK (bucle de inducción), e inhibida por CodY (proteína de unión a DNA que controla la regulación nutricional de diversos genes) (Serror & Sonenshein, 1996; Bergara *et al.*, 2003). Se ha descrito que ComK además inhibe la actividad de  $\sigma^D$  mediante la inducción de la expresión de FlgM (Liu & Zuber, 1998). De este modo, el desarrollo de la competencia inhibe la motilidad haciendo que ambos procesos sean excluyentes entre sí (fig.39 y 44).



**Figura 44: Regulación del activador de la competencia ComK.** Las flechas negras indican inducción y las **T** indican inhibición.

Por otra parte, cuando analizamos la capacidad de competencia de los mutantes de motilidad *motAB*, *hag* y *swrA* observamos que no se podían transformar. Nuestros resultados demuestran que la inhibición debe de estar mediada por una interacción a nivel de competencia tardía, dado que los mutantes en motilidad estudiados presentan expresión de los genes relacionados con la ruta de competencia temprana, como *comA* y el operón de la surfactina. Estos resultados han sido observados al mismo tiempo por otros dos grupos de investigación y publicados recientemente. En ambos estudios se demuestra que los mutantes afectados en la motilidad carecen de la capacidad para desarrollar la competencia debido a la disminución en la expresión basal de *comK* mediada por la acumulación intracelular de DegU~P (Diethmaier *et al.*, 2017; Hölscher *et al.*, 2017). Estos resultados concuerdan con la inhibición de *comK* que observamos en el estudio transcripcional del mutante *motAB* y con los resultados que apuntan a la acumulación de DegU~P en los mutantes de motilidad descritos en el apartado anterior.

En conjunto, estos resultados muestran que, si bien los procesos de motilidad y competencia no pueden darse simultáneamente en la misma célula, sí que son interdependientes siendo necesario el desarrollo de la motilidad para la adquisición de la competencia. De este modo, se ha planteado que las células con motilidad y no las células sésiles, son específicamente las que tendrán la capacidad de desarrollar la competencia (Diethmaier *et al.*, 2017).

Hasta el momento se ha descrito que la producción de eDNA depende del desarrollo de la etapa temprana de la competencia pero no de la tardía (Zafra *et al.*, 2012). Así mismo, hemos demostrado que la motilidad es necesaria para que las células puedan producir eDNA, aunque desconocemos la naturaleza precisa de dicha relación, y que la motilidad no depende de las señales de QS implicadas

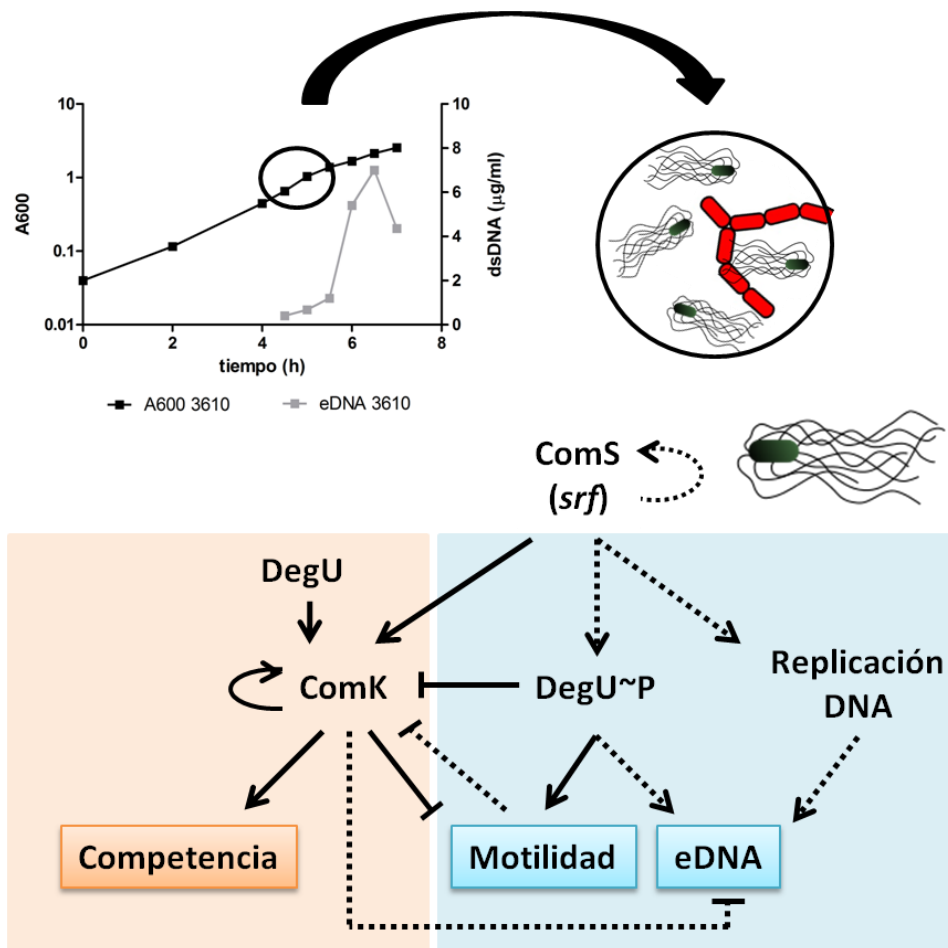
en el desarrollo de la competencia. En conjunto, los datos apuntan a que tanto las células competentes como las productoras de eDNA provienen de células motiles. Dado que competencia y producción de eDNA son fenómenos que se producen al final de la fase exponencial, que comparten una parte de la ruta de señalización (hasta *comS*) y que ambos dependen de las señales de QS, tiene sentido pensar que, una vez que la población alcanza una determinada densidad celular hacia el final de la fase exponencial, las señales de QS activarían en las células con motilidad y mediante la ruta de *comS*, la producción de eDNA o bien la competencia en células diferentes, de tal forma que ambos procesos estén sincronizados y se solapen en el tiempo.

### **5. Modelo de diferenciación celular y exportación del DNA en células productoras**

La regulación de los procesos de diferenciación celular en *B. subtilis* es compleja y depende de factores intrínsecos, ambientales y estocásticos. Los procesos de competencia y producción de eDNA son temporales, produciéndose en un número reducido de células que posteriormente vuelven al estado basal. Las vías de señalización son por tanto altamente reguladas e interconectadas entre sí con numerosos puntos de regulación tales como ComS, DegU, ComK o Spo0A. Es importante entender los cambios como un proceso gradual, una evolución durante el desarrollo de la población en respuesta a las necesidades cambiantes del entorno. Atendiendo a estos factores, a la literatura publicada hasta el momento y a los resultados obtenidos en este trabajo planteamos el siguiente modelo de desarrollo en *B. subtilis*.

Durante la fase de crecimiento exponencial, las células detectan el incremento en la densidad poblacional del cultivo y la disminución en la disponibilidad de nutrientes. De este modo comienzan a liberar señales de QS para activar cambios en las funciones de la población. Al detectar dichas señales mediante los sistemas ComXPA y Opp, se activa la expresión del operón de la surfactina y con ello la síntesis de surfactina y la expresión de *comS*. La síntesis de ComS activaría en un porcentaje de la población de células con motilidad el desarrollo de la competencia tardía, mientras que en otras células, conforme incrementa su concentración intracelular inducirá la producción de eDNA. ComS además inhibe los procesos de esporulación y síntesis de matriz extracelular, al mismo tiempo que induce su propia síntesis en un bucle de activación semejante al de la motilidad (fig.45). Las células en las cuales ComK, junto con DegU, inducen la expresión de *comK*, desarrollan la competencia, inhiben la motilidad y la producción de eDNA y detienen el ciclo celular (replicación del DNA).

Por otro lado, las células en las que no se activó la competencia, ComS activa la producción de eDNA. De este modo ComS activa la maquinaria para la replicación del DNA al mismo tiempo que induce la motilidad. El efecto sobre la motilidad y la producción de eDNA se produce conjuntamente por la acumulación paulatina de bajas concentraciones de DegU~P.

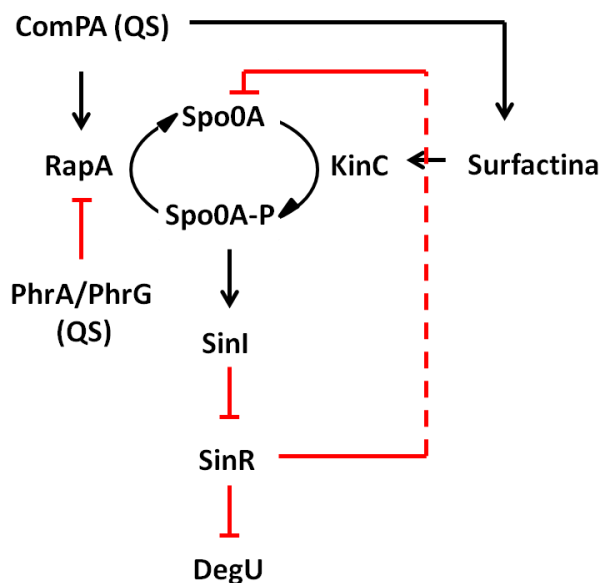


**Figura 45: Posible ruta de regulación que gobierna la producción de eDNA en *B. subtilis* 3610.** En la parte superior se muestra una curva de producción de eDNA de *B. subtilis* 3610 crecidos en MSgg a 37°C (A600 indica la absorbancia y dsDNA la concentración de eDNA en el sobrenadante) y en el detalle un esquema de los tipos celulares presentes en ese momento: cadenas de células sésiles (en rojo) y células con motilidad (verde). En la parte inferior se muestra las dos posibles rutas de señalización que pueden seguir las células con motilidad: competencia (naranja) o producción de eDNA (azul). Las flechas indican inducción mientras que las T indican inhibición. Las líneas con puntos indican relaciones planteadas en este trabajo.

Puesto que ambos procesos, competencia y producción de eDNA, solapan en el tiempo, es razonable pensar que las células competentes sean diferentes a las células productoras de eDNA y que las



células competentes puedan ser transformadas por el eDNA liberado por otras células de la población. Al mismo tiempo, la actividad de ComA, de ComS y la presencia de PhrG/PhrA y de surfactina fomenta el incremento en la concentración de DegU~P e inhibe la fosforilación de Spo0A para evitar que procesos como la síntesis de matriz extracelular o la esporulación tengan lugar, ya que son procesos que se producen en etapas posteriores en la evolución natural del desarrollo de la población (fig.46).



**Figura 46: Regulación de Spo0A.**  
Las flechas negras indican inducción mientras que las **T** indican inhibición. QS = Quorum Sensing.

Conforme la concentración y el grado de fosforilación de DegU aumenta y Spo0A empieza a fosforilarse, se inhiben la motilidad y SinR comenzando así la síntesis de matriz extracelular y de proteasas. Finalmente, Spo0A~P induce el canibalismo y la esporulación en respuesta entre otros, a la falta de nutrientes y la elevada densidad celular, todo ello ya en fase estacionaria.

Los mecanismos moleculares precisos que expliquen la necesidad de la motilidad para la producción de eDNA aún no han podido ser esclarecidos. Sin embargo, en base a la literatura y las características estructurales y funcionales del flagelo, proponemos que puede funcionar como un regulador, ya que actúa como un mecanorreceptor (Cairns *et al.*, 2013), y/o como la maquinaria molecular implicada en transportar el DNA al medio extracelular. En este sentido, el flagelo cuenta con un sistema de secreción denominado T3SS (*Type III Secretion System*) el cual le permite exportar al medio extracelular los componentes del *hook*, del *rod* y del filamento con la ayuda de un complejo ATPasa (Abrusci *et al.*, 2013). El T3SS es la primera parte del flagelo en formarse y se mantiene inactivo hasta

no haberse completado la formación del cuerpo basal, permitiendo una construcción secuencial (Phillips *et al.*, 2015). Tradicionalmente se ha comparado este sistema con el aparato transportador del “infectisoma” utilizado por diversas bacterias patógenas para secretar toxinas directamente en el hospedador (Erhardt *et al.*, 2010; Diepold & Armitage, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que el flagelo de *B. subtilis*, sirve como lugar para la adsorción de los fagos PBS1 y SP3 (Raimondo *et al.*, 1968; Shea & Seaman, 1984). Además, estudios más recientes han descrito que mutantes en motilidad, concretamente en los genes *sigD* y *motA*, tienen afectada la capacidad de conjugación (Rösch *et al.*, 2013). En conjunto, estas evidencias, es decir, la implicación del flagelo en procesos de transferencia génica con virus u otras células bacterianas y la existencia de un sistema de secreción asociado al mismo, nos han llevado a proponer que el flagelo podría actuar como transportador del eDNA, aunque se requiere más investigación para corroborar esta hipótesis.

#### **6. Localización del eDNA en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610**

En este trabajo nos propusimos estudiar la localización del eDNA en las comunidades multicelulares formadas por *B. subtilis* por varias razones. En primer lugar, porque se ha demostrado que en cultivo planctónico de MSgg una pequeña subpoblación de células de *B. subtilis* se diferencia para producir grandes cantidades de eDNA de una forma muy regulada e íntimamente asociada al crecimiento y desarrollo poblacional (Zafra *et al.*, 2012; este trabajo). Además, se ha demostrado que durante el desarrollo de las estructuras aéreas, *B. subtilis* tiene la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares con una distribución espaciotemporal característica, como se describe en la introducción, por lo que es razonable pensar que también habrá una diferenciación en algún momento del desarrollo de estas comunidades en células productoras de eDNA (van Gestel *et al.*, 2015; Vlamakis *et al.*, 2008; Branda *et al.*, 2001; López *et al.* 2010; Veening *et al.* 2006).

A diferencia de otros microorganismos donde se ha estudiado en profundidad la producción de eDNA en el desarrollo de las biopelículas, como es el caso de *P. aeruginosa* o de *N. gonorrhoeae*, (Allesen-holm *et al.*, 2006; Steichen *et al.*, 2011; Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017), se conoce muy poco acerca del eDNA en las comunidades multicelulares formadas por *B. subtilis*. Experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que el eDNA no es necesario para la formación de las estructuras aéreas, puesto que mutantes defectivos en la producción de eDNA eran capaces de desarrollar estas comunidades multicelulares igual que la estipe silvestre, descartándose así que el eDNA pueda tener en *B. subtilis* un rol estructural como ha sido descrito para otros microorganismos

(Moscoso and Claverys, 2004; Allesen-Holm *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Lappann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, el eDNA también puede desempeñar un papel importante contribuyendo a la transferencia génica horizontal, es por ello que decidimos investigar la presencia de eDNA en los cuerpos aéreos. Partiendo de la base de que la producción de eDNA tiene lugar en fase exponencial tardía en cultivo líquido, nos propusimos estudiar la producción de eDNA en estructuras aéreas jóvenes que se empiezan a formar en el margen de colonias crecidas en MSgg. Para ello utilizamos una tinción *live/dead* que marca el DNA de células vivas (colorante *live*) con fluorescencia verde, mientras que colorante *dead* marca con fluorescencia roja tanto el DNA presente en el medio como en el interior de las células muertas. Como control negativo se utilizó el mutante 3610 *oppA::miniTn10* que forma estructuras aéreas, pero es defectivo en producción de eDNA. Los resultados de las muestras observadas al microscopio de fluorescencia mostraron la presencia de DNA en el espacio extracelular en las estructuras aéreas jóvenes de la estirpe 3610, aparentemente repartido de forma uniforme por toda la colonia. Sin embargo, ese DNA no se corresponde con el eDNA puesto que el control negativo presenta un patrón de tinción semejante. Al analizar los cuerpos aéreos mediante tinción con DDAO (marcaje del DNA localizado en el exterior celular) observamos de nuevo que no había diferencias con el control negativo. El DNA que estamos observando en el espacio extracelular de las estructuras aéreas podría estar generándose por varios mecanismos, por ejemplo, a partir de la lisis de las células que esporulan, por fenómenos de canibalismo o por lisis celular programada localizada (Branda *et al.*, 2001; Vlamakis *et al.*, 2008; González-Pastor *et al.*, 2003; Allocati *et al.*, 2015, Gingichashvili *et al.*, 2017). No obstante, en los numerosos estudios en los que se describe la matriz extracelular de *B. subtilis*, no se ha detectado DNA como componente de la misma, por lo tanto es razonable pensar que las condiciones utilizadas en estos experimentos podrían estar generando mayor muerte celular en la colonia, traducándose en el marcaje de DNA que observamos en nuestros resultados (López *et al.*, 2010; Vlamakis *et al.*, 2013; Hobley *et al.*, 2015; Arnaouteli *et al.*, 2017). Finalmente, considerando que la tinción es poco intensa, no podemos descartar que lo que estamos observando sea únicamente fondo de tinción, que persista a pesar de los lavados realizados a la muestra.

Para poder analizar con mayor detalle la producción de eDNA en los cuerpos aéreos sería necesario realizar un marcaje genético utilizando como diana algún gen asociado a la producción de eDNA. Para ello realizamos sin éxito una serie de experimentos buscando identificar a las células

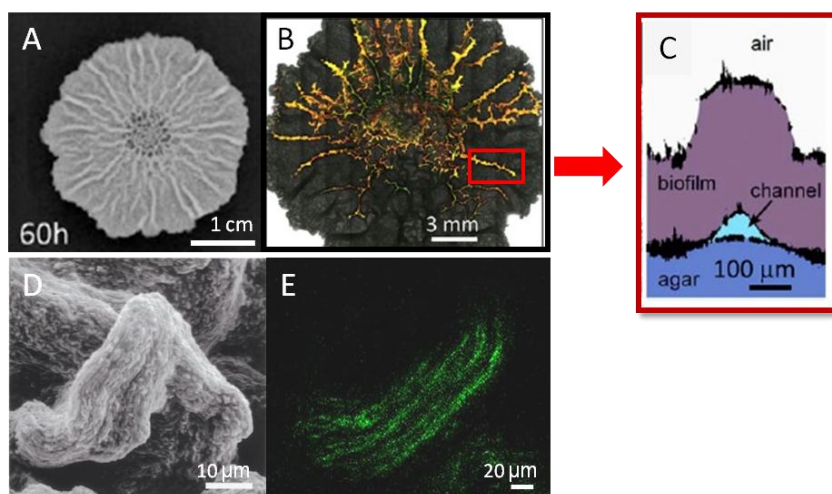
productoras de eDNA (resultados no mostrados), mediante un marcaje fluorescente de fusión de proteína con GFP en los siguientes genes: *dnaX*, que codifica para la DNA polimerasa III (Lemon & Grossman, 1998), *spo0J*, que codifica para una proteína implicada en el posicionamiento del cromosoma bacteriano cerca del polo celular en el momento de la septación asimétrica durante la esporulación (Cervin *et al.*, 1998); y *hbsU*, que codifica una proteína de unión a DNA implicada en los procesos de recombinación homóloga y de reparación del DNA (Fernández & Alonso, 1999). Se utilizaron marcajes en estas proteínas partiendo de la base de que las células productoras de eDNA deben tener muy activada la replicación del DNA, hipótesis sustentada sobre los experimentos con DAPI realizados en este trabajo y sobre los estudios con citometría de flujo realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Zafra *et al.*, 2012). Sin embargo, no pudimos hallar células con un mayor marcaje fluorescente, por lo que se requieren más experimentos que permitan identificar los genes adecuados para identificar las células productoras de eDNA.

Por otro lado, en este trabajo hemos asociado la motilidad a la producción de eDNA, por lo tanto, investigar las células con motilidad puede aportar información sobre la posible distribución del eDNA en las estructuras aéreas de 3610.

#### **7. Las células con motilidad se desplazan por el interior de los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610**

Durante los estudios con microscopía óptica de los cuerpos aéreos pudimos observar la presencia de células con motilidad en su interior. Dado que este fenómeno no había sido descrito con anterioridad y a fin de comprender la distribución de las células con motilidad en el seno de las estructuras aéreas formadas por *B. subtilis*, en primer lugar quisimos identificar la estructura interna de los cuerpos aéreos de 3610. El objetivo fue utilizar una técnica que nos permitiera ver la estructura tridimensional de la colonia sin alterar, en su estado natural, para lo que usamos LTSEM (Ríos *et al.*, 2007). Sorprendentemente los resultados mostraron que el interior de las estructuras aéreas presentan una elevada organización al estar formados por numerosos micro-conductos, similares a capilares, que los recorren internamente delimitados por monocapas de células alineadas adheridas entre sí. Además, se analizó la estructura interna en colonias formadas por el mutante 3610 *yveQ::tet* defectivo en producción de exopolisacáridos y que no forma estructuras aéreas (Branda *et al.*, 2001), y se observó que carece de dichos conductos. A diferencia de la estirpe silvestre, el mutante posee una estructura interna porosa, en la que se forman cavidades abiertas conectadas entre sí, en lugar de micro-conductos. De esta forma, con este trabajo hemos revelado que en el interior de las

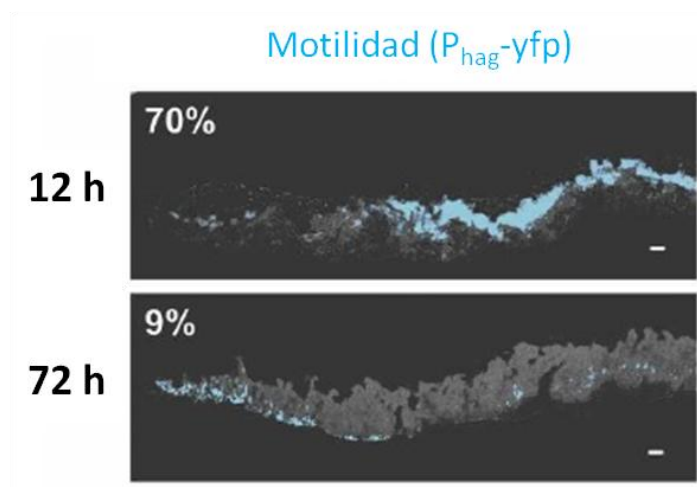
estructuras aéreas de *B. subtilis* las células se organizan con una mayor complejidad de lo que se pensaba.



**Figura 47: Diferencias entre macro y micro-conductos.** A) Colonia de *B. subtilis* 3610 tras 60h de incubación en MSgg donde se aprecia la formación de pliegues macroscópicos; B) imagen de microscopía de la biopelícula donde se muestra la conectividad de los macro-conductos mediante inyección de una solución acuosa fluorescente; C) esquema del macro-conducto; A, B y C extraídos de Wilking *et al.*, 2012. D) Cuerpo aéreo de *B. subtilis* 3610 (extraído de Branda *et al.*, 2001); E) marcaje fluorescente de las células con motilidad en un cuerpo aéreo de *B. subtilis* 3610 (este trabajo). Biofilm = biopelícula; channel = canal; air = aire.

Hay que diferenciar los micro-conductos que se han identificado en el interior de las estructuras aéreas en este trabajo, de una serie de canales o conductos que constituyen una red interna que se encuentran por debajo de los característicos pliegues macroscópicos de las colonias de *B. subtilis* 3610 y que se propuso servirían para el flujo de nutrientes (fig.47) (Bridier *et al.*, 2011; Wilking *et al.*, 2012). A diferencia de estos macro-canales, lo que describimos en este trabajo son unos conductos de mucho menor diámetro (visibles únicamente mediante microscopía SEM), localizados en el interior de los cuerpos aéreos (fig.47). Estos micro-conductos no han sido descritos con anterioridad posiblemente por diferencias en las técnicas utilizadas, que no tienen la suficiente resolución y que producen el colapso de las estructuras observadas como resultado de la deshidratación de la muestra (Wilking *et al.*, 2012; Hollenbeck *et al.*, 2016; Toyofuku *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Además, la mayoría de los estudios se centran en estudiar la estructura de la colonia entera mientras que nosotros nos hemos centrado en los cuerpos aéreos (Gingichashvill *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

La formación de la estructura tridimensional de las estructuras aéreas, además de depender de procesos físicos también depende de la distribución, migración y ordenación de los subtipos celulares durante su desarrollo (Allocati *et al.*, 2015; Oldewurtel *et al.*, 2015; van Gestel *et al.*, 2015). En *B. subtilis* se han identificado varios tipos de células especializadas, como son las células con motilidad, las células productoras de matriz extracelular o las células que esporulan. Concretamente el número y la distribución de las células con motilidad varía con el tiempo (fig.48): mientras que en las colonias jóvenes existe un elevado porcentaje de células con motilidad (70 % a las 12 h de cultivo en MSgg) localizadas en la parte central y superficial de la colonia; conforme la colonia madura éstas pasan a localizarse en la base y periferia, al mismo tiempo que su proporción se reduce gradualmente (llegando al 9 % de células motiles a las 72 h), aunque incluso en las colonias más maduras existe una población remanente de células con motilidad (Vlamakis *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017).



**Figura 48: Distribución de las células con motilidad en una colonia de *B. subtilis* a lo largo de su desarrollo.** Distribución de las células con motilidad (azul) en secciones transversales de biopelículas de *B. subtilis* a las 12h y 72h de crecimiento. Adaptado de Vlamakis *et al.*, 2008.

El papel que desempeña la motilidad en el desarrollo de estas comunidades multicelulares no termina de quedar claro. Se ha descrito en diversos estudios que la motilidad está implicada en el desarrollo de las biopelículas pero mientras que algunos plantean que afecta al desarrollo temporal y no a la morfología, otros reportan que la motilidad es fundamental para conformar su estructura tridimensional (Mirel *et al.*, 1992; O'Toole *et al.*, 2000; Chagneau & Saier, 2004; Vlamakis *et al.*, 2013; Tasaki *et al.*, 2017). Conforme a nuestros resultados, la motilidad no afecta a la estructura de los cuerpos aéreos puesto que el mutante en motilidad *hag* produce un fenotipo silvestre. Es probable que las diferencias observadas se deban a diferencias en las estirpes utilizadas y en las condiciones de experimentación puesto que se ha visto que factores como el pH o la disponibilidad de nutrientes

según el medio de crecimiento utilizado afectan a la morfología y en particular al número de células con motilidad presentes en la biopelícula (Wang *et al.*, 2011; Tasaki *et al.*, 2017).

Durante el análisis de la estructura interna de los cuerpos aéreos pudimos detectar células con movimiento. Como se mencionó anteriormente, en este trabajo hemos puesto de manifiesto la relación entre motilidad y producción de eDNA, por lo que la detección de células con movimiento en el interior de los cuerpos aéreos nos llevó a analizar su distribución mediante marcaje fluorescente de las células productoras de flagelina, el principal componente del flagelo (3610 *P<sub>hag</sub>-gfp*). Los resultados de microscopía de fluorescencia y confocal, mostraron que hay un gran número de células que expresan flagelina, lo cual concuerda con la edad de las estructuras aéreas y con el medio de crecimiento utilizado (puesto que en MSgg el número de células con motilidad es mayor que en LB) (Wang *et al.*, 2011; Tasaki *et al.*, 2017). Sorprendentemente las células se encontraban distribuidas por el interior de los cuerpos aéreos de una forma muy particular: formando “bandas” paralelas. Como se muestra en las fig.37 y 38 del capítulo 3 de Resultados, las bandas se distribuyen paralelamente entre sí y con el eje longitudinal del cuerpo aéreo. Considerando que en el interior de las estructuras aéreas las células se organizan formando micro-conductos, como hemos descrito en este trabajo, resultaba tentador pensar que las células motiles puedan encontrarse distribuidas por su interior como indicaba su localización. Para probar esta hipótesis, realizamos unos vídeos de los cuerpos aéreos formados por la estirpe 3610 *P<sub>hag</sub>-gfp*, en los cuales se puede observar cómo las células que expresan flagelina (fluorescencia verde) se mueven por el interior de los cuerpos aéreos. Este dato es importante porque confirma que las células marcadas son células libres que poseen movimiento y por tanto, que se desplazan activamente por el interior del cuerpo aéreo.

El hecho de que las células puedan moverse libremente por el interior del cuerpo aéreo apoya la teoría de que se desplazan por el interior de los espacios generados por los micro-conductos, así como que dichos espacios poseen fluidos en su interior. Esta estructura interna con micro-conductos podría servir para facilitar el flujo de agua y nutrientes necesarios para el desarrollo de estas estructuras aéreas, e incluso eliminar los desechos producidos, especialmente en las zonas más alejadas del sustrato donde la escasez de nutrientes y acumulación de desechos es más intensa (Allocati *et al.*, 2015). Dado que conforme a nuestros resultados la motilidad es necesaria para la producción de eDNA y habiendo descartado que el eDNA posea un papel estructural en la formación de las estructuras aéreas, es posible también hipotetizar que el eDNA sea producido y liberado en los

micro-conductos por las células con motilidad para que pueda ser difundido rápidamente promoviendo la transferencia horizontal génica. Este proceso dotaría a estas comunidades multicelulares de un mecanismo eficaz de adaptación a condiciones adversas facilitando el intercambio de material genético. La difusión del eDNA por los micro-conductos podría dificultar su detección, por lo que sería necesario emplear otras técnicas y marcadores para verificar esta hipótesis.



# ***CONCLUSIONES***

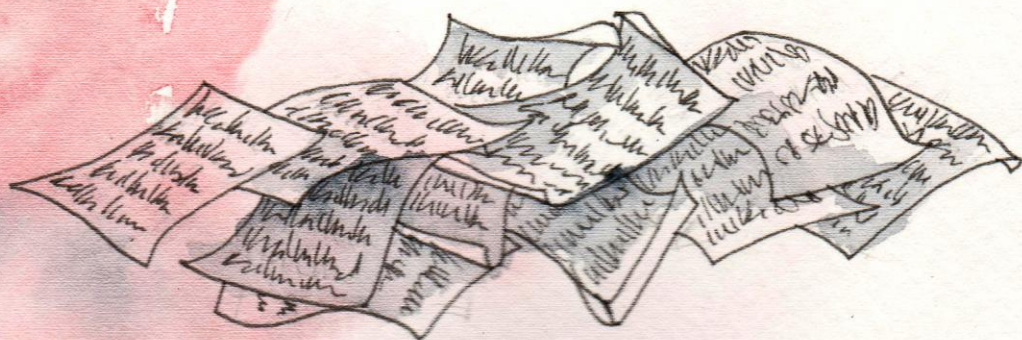
---

## CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La actividad del gen *comS* es necesaria para la correcta producción de eDNA en *B. subtilis* 3610. Sin embargo, su regulación resulta compleja, dependiendo de algún factor adicional aún por caracterizar.
2. ComS induce de forma directa o indirecta la expresión de los genes de motilidad.
3. ComS se encuentra implicada en más procesos celulares de los que inicialmente se pensaba. En este trabajo hemos podido demostrar que, además de estar implicada en la producción de eDNA y en la activación de la motilidad, también afecta de forma directa o indirecta a los fenómenos de esporulación y de producción de matriz extracelular y exoproteasas.
4. El desarrollo de la motilidad es necesario para la correcta producción de eDNA. Esta relación podría deberse a una relación indirecta, en la que el flagelo actúe como mecanorreceptor, o bien directa, puesto que diversas evidencias apuntan a que el eDNA pudiera secretarse a través de la estructura flagelar.
5. Se demostró que los mutantes en motilidad pierden la capacidad de desarrollar la competencia y que la competencia temprana no estaba implicada en este proceso.
6. Tanto los resultados obtenidos en el estudio de *comS* como en el estudio de la motilidad apuntan a que la acumulación intracelular de DegU~P inhibe la producción de eDNA.
7. No se detectó eDNA en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* mediante las técnicas utilizadas. Este resultado apoya los resultados previos que descartan un papel estructural
8. Se describe por primera vez que el interior de los cuerpos aéreos posee una estructura compleja formada por numerosos micro-conductos, y que las células con motilidad se desplazan en su interior.

# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Ababneh, Q. O., & Herman, J. K. (2015). CodY regulates SigD levels and activity by binding to three sites in the fla/che operon. *J Bacteriol.*, 197(18), 2999-3006.
- Abrusci, P., Vergara-Irigaray, M., Johnson, S., Beeby, M. D., & Hendrixson, D. R. (2013). Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(1), 99-104.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., et al. (2006). A characterization of DNA release in pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Mol Microbiol.*, 59(4), 1114-1128.
- Alvarez-Martinez, C. E., & Christie, P. J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 73(4), 775-808.
- Amati, G., Bisicchia, P., & Galizzi, A. (2004). DegU-P represses expression of the motility fla-che operon in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 186(18), 6003-6014.
- Anderson, G. G., & O'Toole, G. A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 322, 85-105.
- Arnaouteli, S., Ferreira, A. S., Schor, M., Morris, R. J., Bromley, K. M., Jo, J., et al. (2017). Bifunctionality of a biofilm matrix protein controlled by redox state. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 114(30), E6184-E6191.
- Asally, M., Kittisopikul, M., Rué, P., Du, Y., Hu, Z., Çağatay, T., et al. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109(46), 18891-18896.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., et al. (1994). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Avery, S. V. (2005). Cell individuality: The bistability of competence development. *Trends Microbiol.*, 13(10), 459-462.
- Baptista, C., Barreto, H. C., & São-José, C. (2013). High levels of DegU-P activate an esat-6-like secretion system in bacillus subtilis. *PLoS One.*, 8(7), e67840.
- Barilla, D., Caramori, T., & Galizzi, A. (1994). Coupling of flagellin gene transcription to flagellar assembly in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 176(15), 4558-4564.
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., et al. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Environ Microbiol.*, 10(9), 2331-2343.
- Barnes, M. H., Leo, C. J., & Brown, N. C. (1998). DNA polymerase III of gram-positive eubacteria is a zinc metalloprotein conserving an essential finger-like domain. *Biochemistry*, 37(44), 15254-15260.
- Barnes, A. M. T., Ballering, K. S., Leibman, R. S., Wells, C. L., & Dunny, G. M. (2012). Enterococcus faecalis produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *Mbio*, 3(4): e00193-12.
- Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa, J., Patarroyo, J. C., Aguilera, R., & Márquez-Magaña, L. M. (2003). CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in bacillus subtilis *J Bacteriol.*, 185(10), 3118-3126.
- Berntsson, R. P., Doeve, M. K., Fusetti, F., Duurkens, R. H., Sengupta, D., Marrink, S. J., et al. (2009). The structural basis for peptide selection by the transport receptor OppA. *Embo j.*, 28(9), 1332-1340.
- Bertero, M. G., Gonzales, B., Tarricone, C., Cecilian, F., & Galizzi, A. (1999). Overproduction and characterization of the bacillus subtilis anti-sigma factor FlgM. *J Biol Chem.*, 274(17), 12103-12107.

- Blackman, S. A., Smith, T. J., & Foster, S. J. (1998). The role of autolysins during vegetative growth of bacillus subtilis 168. *Microbiology*, 144(1), 73-82.
- Blair, D. F., & Berg, H. C. (1988). Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science*, 242(4886), 1678-1681.
- Blair, K. M., Turner, L., Winkelman, J. T., Berg, H. C., & Kearns, D. B. (2008). A molecular clutch disables flagella in the bacillus subtilis biofilm. *Science*, 320(5883), 1636-1638.
- Bloom-Ackermann, Z., Steinberg, N., Rosenberg, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Pollack, D., Ely, S., et al. (2016). Toxin-antitoxin systems eliminate defective cells and preserve symmetry in bacillus subtilis biofilms. *Environ Microbiol.*, 18(12), 5032-5047.
- Borenstein, S., & Ephrati-Elizur, E. (1969). Spontaneous release of DNA in sequential genetic order by bacillus subtilis. *J Mol Biol.*, 45(1):137-52.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the bacillus subtilis biofilm matrix. *Mol Microbiol.*, 59(4), 1229-1238.
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(20), 11621-11626.
- Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S., & Briandet, R. (2011). The spatial architecture of bacillus subtilis biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *Plos One*, 6(1), e16177.
- Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R., et al. (2002). Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 184(17), 4881-4890.
- Burkholder, P. R., & Giles, N. H. (1947). Induced biochemical mutations in bacillus subtilis. *Am J Bot.*, 34(6), 345-348.
- Cairns, L. S., Laura, H., & Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by bacillus subtilis: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol.*, 93(4), 587-598.
- Cairns, L. S., Marlow, V. L., Emma, B., Adam, O., & Stanley-Wall, N. R. (2013). A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 90(1), 6-21.
- Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Cecilian, F., et al. (2005). Swarming differentiation and swimming motility in bacillus subtilis are controlled by swrA, a newly identified dicistronic operon. *J Bacteriol.*, 187(15), 5356-5366.
- Calvio, C., Osera, C., Amati, G., & Galizzi, A. (2008). Autoregulation of swrAA and motility in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 190(16), 5720-5728.
- Caramori, T., Barilla, D., Nessi, C., Sacchi, L., & Galizzi, A. (1996). Role of FlgM in sigma D-dependent gene expression in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 178(11), 3113-3118.
- Carrolo, M., Frias, M. J., Pinto, F. R., Melo-Cristino, J., & Ramirez, M. (2010). Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in streptococcus pneumoniae. *PLoS One*, 5(12), e15678.
- Cervin, M. A., Spiegelman, G. B., Brian, R., Kari, O., Marta, P., & Hoch, J. A. (1998). A negative regulator linking chromosome segregation to developmental transcription in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 29(1), 85-95.
- Chagneau, C., & Saier, M. H. J. (2004). Biofilm-defective mutants of bacillus subtilis. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 8(3), 177-188.
- Chan, J. M., Guttenplan, S. B., & Kearns, D. B. (2014). Defects in the flagellar motor increase synthesis of poly-γ-glutamate in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 196(4), 740-753.

- Chen, R., Guttenplan, S. B., Blair, K. M., & Kearns, D. B. (2009). Role of the sigD-dependent autolysins in bacillus subtilis population heterogeneity. *J Bacteriol.*, 191(18), 5775-5784.
- Christine, D., Ravi, C., Alexandra, C., Kearns, D. B., Lele, P. P., & David, D. (2017). Viscous drag on the flagellum activates bacillus subtilis entry into the K-state. *Mol Microbiol.*, 106(3), 367-380.
- Chu, F., Kearns, D. B., Branda, S. S., Kolter, R., & Losick, R. (2006). Targets of the master regulator of biofilm formation in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 59(4), 1216-1228.
- Chung, J. D., Stephanopoulos, G., Ireton, K., & Grossman, A. D. (1994). Gene expression in single cells of bacillus subtilis: Evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J Bacteriol.*, 176(7), 1977-1984.
- Comella, N., & Grossman, A. D. (2005). Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 57(4), 1159-1174.
- Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., & Zuber, P. (1998). Altered srf expression in bacillus subtilis Resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *J Bacteriol.*, 180(6), 1438-1445.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., et al. (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 8(5), 821-831.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Cozy, L. M., & Kearns, D. B. (2010). Gene position in a long operon governs motility development in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 76(2), 273-285.
- Cozy, L. M., Phillips, A. M., Calvo, R. A., Bate, A. R., Hsueh Yi-Huang, Richard, B., et al. (2012). SlrA/SinR/SlrR inhibits motility gene expression upstream of a hypersensitive and hysteretic switch at the level of  $\sigma$ D in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 83(6), 1210-1228.
- Crabb, W. D., Streips, U. N., & Doyle, R. J. (1977). Selective enrichment for genetic markers in DNA released by competent cultures of bacillus subtilis. *Mol Gen Genet.*, 155(3), 179-183.
- Daniel, L., Hera, V., & Roberto, K. (2008). Generation of multiple cell types in bacillus subtilis. *FEMS Microbiol Rev.*, 33(1), 152-163.
- D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., & Pesci, E. C. (2002). Autolysis and autoaggregation in pseudomonas aeruginosa colony morphology mutants. *J Bacteriol.*, 184(23), 6481-6489.
- de los Ríos, A., Martin, G., Sancho, L. G., & Carmen, A. (2007). Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing antarctic granite rocks. *FEMS Microbiol Ecol.*, 59(2), 386-395.
- DeLange, R. J., Chang, J. Y., Shaper, J. H., & Glazer, A. N. (1976). Amino acid sequence of flagellin of bacillus subtilis 168. III. tryptic peptides, N-bromosuccinimide peptides, and the complete amino acid sequence. *J Biol Chem.*, 251(3), 705-711.
- Diepold, A., & Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: The bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 370(1679), 20150020.
- Dillard, J. P., & Seifert, H. S. (2001). A variable genetic island specific for neisseria gonorrhoeae is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol.*, 41(1), 263-277.
- Domenech, M., García, E., Prieto, A., & Moscoso, M. (2013). Insight into the composition of the intercellular matrix of streptococcus pneumoniae biofilms. *Environ Microbiol.*, 15(2), 502-516.



- Dorward, D. W., Garon, C. F., & Judd, R. C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of neisseria gonorrhoeae. *J of Bacteriol*, 171(5), 2499-2505.
- Douwe, S., Amy, L., Liyun, K., David, D., Gerard, V., & Leendert, H. (2006). comK encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 15(3), 455-462.
- D'Souza, C., Nakano, M. M., & Zuber, P. (1994). Identification of comS, a gene of the srfA operon that regulates the establishment of genetic competence in bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91(20), 9397-9401.
- D'Souza, C., Nakano, M. M., Frisby, D. L., & Zuber, P. (1995). Translation of the open reading frame encoded by comS, a gene of the srf operon, is necessary for the development of genetic competence, but not surfactin biosynthesis, in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 177(14), 4144-4148.
- Dubnau, D. (1999). DNA uptake in bacteria. *Ann Rev Microbiol.*, 53, 217-244.
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in bacillus subtilis. *Microbiol Rev.*, 55(3), 395-424.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., et al. (2008). The complete genome sequence of escherichia coli DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol.*, 190(7), 2597-2606.
- Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.*, 16(6), 269-275.
- Eisen, M. B., & Brown, P. O. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods in Enzymology*, 303(Supplement C), 179-205.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H. S., & Håvarstein, L. S. (2009). Fratricide in streptococcus pneumoniae: Contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology*, 155(7), 2223-2234.
- Erhardt, M., Namba, K., & Hughes, K. T. (2010). Bacterial nanomachines: The flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), a000299.
- Fall, R., Kearns, D. B., & Nguyen, T. (2006). A defined medium to investigate sliding motility in a bacillus subtilis flagella-less mutant. *BMC Microbiol.*, 17(1), 31.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., & Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 8063-8068.
- Fernández, S., & Alonso, J. C. (1999). Bacillus subtilis sequence-independent DNA-binding and DNA-bending protein hbsu negatively controls its own synthesis. *Gene*, 231(1-2):187-93.
- Ferris, H. U., & Minamino, T. (2006). Flipping the switch: Bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol.*, 14(12), 519-526.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.*, 8(9), 623-633.
- Frances, C., Kearns, D. B., Anna, M., Yunrong, C., Roberto, K., & Richard, L. (2008). A novel regulatory protein governing biofilm formation in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 68(5), 1117-1127.
- Freese, E., Heinze, J. E., & Galliers, E. M. (1979). Partial purine deprivation causes sporulation of bacillus subtilis in the presence of excess ammonia, glucose and phosphate. *Microbiology*, 115(1), 193-205.
- Fujita, M., González-Pastor, J. E., & Losick, R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of bacillus subtilis. *J of Bacteriol*, 187(4), 1357-1368.
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., & Senesi, S. (2012). Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in bacillus subtilis. *Appl Environ Microbiol.*, 78(18), 6540-6544.

- Gingichashvili, S., Duanis-Assaf, D., Shemesh, M., Featherstone, J. D. B., Feuerstein, O., & Steinberg, D. (2017). *Bacillus subtilis* biofilm development - A computerized study of morphology and kinetics. *Front Microbiol.*, 7(8), 2072.
- Gloag, E. S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L. M., et al. (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *PNAS*, 110(28), 11541-11546.
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., & Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301(5632), 510-513.
- Grande, R., Di Marcantonio, M. C., Robuffo, I., Pompilio, A., Celia, C., Di Marzio, L., . . . Mincione, G. (2015). *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 outer membrane vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Front Microbiol.*, 6, 1369.
- Greiner, L. L., Edwards, J. L., Shao, J., Rabinak, C., Entz, D., & Apicella, M. A. (2005). Biofilm formation by neisseria gonorrhoeae. *Infection and Immunity*, 73(4), 1964-1970.
- Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet.*, 29(1), 477-508.
- Guérout-Fleury, A., Frandsen, N., & Stragier, P. (1996). Plasmids for ectopic integration in *bacillus subtilis*. *Gene*, 180(1-2):57-61.
- Guérout-Fleury, A., Shazand, K., Frandsen, N., & Stragier, P. (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *bacillus subtilis*. *Gene*, 167(1-2):335-6.
- Guttenplan, S. B., Shaw, S., & Kearns, D. B. (2013). The cell biology of peritrichous flagella in *bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*, 87(1), 211-229.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, 2(2), 95-108.
- Hamilton, H. L., Domínguez, N. M., Schwartz, K. J., Hackett, K. T., & Dillard, J. P. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol.*, 55(6), 1704-1721.
- Hamoen, L. W., Van Werkhoven, A. F., Venema, G., & Dubnau, D. (2000). The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97(16), 9246-9251.
- Hamoen, L. W., Hans, E., Jan, J., Gerard, V., & Douwe, S. (1995). A small gene, designated comS, located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*, 15(1), 55-63.
- Hamoen, L. W., Venema, G., & Kuipers, O. P. (2003). Controlling competence in *bacillus subtilis*: Shared use of regulators. *Microbiology*, 149(1), 9-17.
- Hamze, K., Autret, S., Hinc, K., Laalami, S., Julkowska, D., Briandet, R., et al. (2011). Single-cell analysis in situ in a *bacillus subtilis* swarming community identifies distinct spatially separated subpopulations differentially expressing hag (flagellin), including specialized swimmers. *Microbiology*, 157(9), 2456-2469.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.*, 166(4), 557-580.
- Harwood, C. R., & Cutting, S. M. (1990). *Molecular biological methods for bacillus subtilis*. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G., & Morrison, D. A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(24), 11140-11144.



- Hayakawa, J., & Ishizuka, M. (2012). Temperature-dependent self-splicing group I introns in the flagellin genes of the thermophilic bacillus species. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 76(2), 410-413.
- Hogley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev.*, 39(5), 649-669.
- Hollenbeck, E. C., Douarche, C., Allain, J. M., Roger, P., Regeard, C., Cegelski, L., et al. (2016). Mechanical behavior of a bacillus subtilis pellicle. *J Phys Chem B.*, 120(26), 6080-6088.
- Hölscher Theresa, Tina, S., Dragoš Anna, Dietel Anne-Kathrin, Christian, K., & Kovács Ákos T. (2017). Impaired competence in flagellar mutants of bacillus subtilis is connected to the regulatory network governed by DegU. *Environ Microbiol Rep.*, 10(1), 23-32.
- Hsueh Yi-Huang, Cozy, L. M., Sham Lok-To, Calvo, R. A., Gutu, A. D., Winkler, M. E., et al. (2011). DegU-phosphate activates expression of the anti-sigma factor FlgM in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 81(4), 1092-1108.
- Ibáñez de Aldecoa, A., Zafra, O., & González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front Microbiol.*, 8, 1390.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96(1):23-8.
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., . . . Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. *PNAS*, 112(36), 11353-11358.
- Jorge, O., Bolaños Victor, Stuart, C., Eugenio, F., Francisco, B., & Fernando, V. (1996). A functional Spo0A is required for maximal aprE expression in bacillus subtilis. *FEBS Letters*, 381(1-2), 29-31.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B., & Séror, S. J. (2005). Comparative analysis of the development of swarming communities of bacillus subtilis 168 and a natural wild type: Critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J Bacteriol.*, 187(1), 65-76.
- Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from pseudomonas aeruginosa on other bacteria including pathogens: Conceptually new antibiotics. *J Bacteriol.*, 178(10), 2767-2774.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., & Håvarstein, L. S. (2005). Choline-binding protein D (CbpD) in streptococcus pneumoniae is essential for competence-induced cell lysis. *J of Bacteriol.*, 187(13), 4338-4345.
- Kazuo, K. (2007). Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 66(2), 395-409.
- Kearns, D. B. (2008). Division of labour during bacillus subtilis biofilm formation. *Mol Microbiol.*, 67(2), 229-231.
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 49(3), 581-590.
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of bacillus subtilis. *Genes Dev.*, 19(24), 3083-3094.
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Mol Microbiol.*, 50(1), 61-68.

- Kunst, F., Msadek, T., Bignon, J., & Rapoport, G. (1994). The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in bacillus subtilis. *Res Microbiol.*, 145(5), 393-402.
- Lanz, M. A., Farhat, M., & Klostermeier, D. (2014). The acidic C-terminal tail of the GyrA subunit moderates the DNA supercoiling activity of bacillus subtilis gyrase. *J Biol Chem.*, 289(18), 12275-12285.
- Lappann, M., Claus, H., Van Alen, T., Harmsen, M., Elias, J., Molin, S., et al. (2010). A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of neisseria meningitidis. *Mol Microbiol.*, 75(6), 1355-1371.
- Lazarevic, V., Margot, P., Soldo, B., & Karamata, D. (1992). Sequencing and analysis of the bacillus subtilis lytRABC divergon: A regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J Gen Microbiol.*, 138(9), 1949-1961.
- Lazazzera, B. A., & Grossman, A. D. (1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.*, 6(7), 288-294.
- Lazazzera, B. A. (2001). The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides*, 22(10):1519-27.
- Lazazzera, B. A., Kurtser, I. G., McQuade, R. S., & Grossman, A. D. (1999). An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 181(17), 5193-5200.
- Lazazzera, B. A., Solomon, J. M., & Grossman, A. D. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in B. subtilis. *Cell*, 89(6), 917-925.
- Lehmann, K., & Schmidt, U. (2003). Group II introns: Structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 38(3), 249-303.
- Leighton, C., & Marta, P. (2003). TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 49(6), 1509-1522.
- Lemon, K. P., & Grossman, A. D. (1998). Localization of bacterial DNA polymerase: Evidence for a factory model of replication. *Science*, 282(5393), 1516-1519.
- Liu, J., & Zuber, P. (1998). A molecular switch controlling competence and motility: Competence regulatory factors ComS, MecA, and ComK control  $\zeta$ D-dependent gene expression in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 180(16), 4243-4251.
- Liu, L., Nakano, M. M., Lee, O. H., & Zuber, P. (1996). Plasmid-amplified comS enhances genetic competence and suppresses sinR in bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 178(17), 5144-5152.
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2(7): a000398.
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Cannibalism enhances biofilm development in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 74(3), 609-618.
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev.*, 23(14), 1631-1638.
- Lorenz, M. G., Gerjets, D., & Wackernagel, W. (1991). Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Arch Microbiol.*, 156(4), 319-326.
- Mah, T. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 9(1):34-9.
- Margot, P., & Karamata, D. (1992). Identification of the structural genes for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier in bacillus subtilis 168: Inactivation of these genes by insertional mutagenesis has no effect on growth or cell separation. *Mol Gen Genet.*, 232(3), 359-366.

- Margot, P., Pagni, M., & Karamata, D. (1999). Bacillus subtilis 168 gene lytF encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, sigmaD. *Microbiology*, 145 (Pt 1):57-65.
- Márquez-Magaña, L. M., & Chamberlin, M. J. (1994). Characterization of the sigD transcription unit of bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 176(8), 2427-2434.
- Martin, D. (1999). Fibrils as extracellular appendages of bacteria: Their role in contact-mediated cell-cell interactions in myxococcus xanthus. *Bioessays*, 21(7), 590-595.
- Matz, C., & Kjelleberg, S. (2005). Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.*, 13(7), 302-307.
- Mhatre, E., Troszok, A., Gallegos-Monterrosa, R., Lindstädt, S., Hölscher, T., Kuipers, O. P., et al. (2016). The impact of manganese on biofilm development of bacillus subtilis. *Microbiology*, 162(8), 1468-1478.
- Michael, J. K., Ursula, R., & James, E. B. (1992). Isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside influences the metabolism of escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 36, 782-784.
- Mirel, D. B., & Chamberlin, M. J. (1989). The bacillus subtilis flagellin gene (hag) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase. *J Bacteriol.*, 171(6), 3095-3101.
- Mirel, D. B., Lauer, P., & Chamberlin, M. J. (1994). Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a sigma D-dependent operon of bacillus subtilis. *J Bacteriol.*, 176(15), 4492-4500.
- Mirel, D. B., Lustre, V. M., & Chamberlin, M. J. (1992). An operon of bacillus subtilis motility genes transcribed by the sigma D form of RNA polymerase. *J Bacteriol.*, 174(13), 4197-4204.
- Mirel, D. B., Estacio, W. F., Mathieu, M., Olmsted, E., Ramirez, J., & Márquez-Magaña, L. M. (2000). Environmental regulation of bacillus subtilis sigD-dependent gene expression. *J Bacteriol.*, 182(11), 3055-3062.
- Mitsuo, O., Kana, S., Kei, A., Naotake, O., & Teruo, T. (2003). Binding of response regulator DegU to the aprE promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, 49(6), 1685-1697.
- Mitsuo, O., & Yasutaro, F. (2007). Bacillus subtilis rapD, a direct target of transcription repression by RghR, negatively regulates srfA expression. *FEMS Microbiol Lett.*, 268(1), 73-80.
- Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 255-261.
- Mordini, S., Osera, C., Marini, S., Scavone, F., Bellazzi, R., Galizzi, A., et al. (2013). The role of SwrA, DegU and PD3 in fla/che expression in B. subtilis. *PLoS One*, 8(12), e85065.
- Moscoso, M., & Claverys, J. (2004). Release of DNA into the medium by competent streptococcus pneumoniae: Kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol.*, 54(3), 783-794.
- Moscoso, M., García, E., & López, R. (2006). Biofilm formation by streptococcus pneumoniae: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J of Bacteriol*, 188(22), 7785-7795.
- Mukherjee, S., & Kearns, D. B. (2014). The structure and regulation of flagella in bacillus subtilis. *Ann Rev Genet.*, 48(1), 319-340.
- Müller, S., Hoffmann, T., Santos, H., Saum, S. H., Bremer, E., & Müller, V. (2011). Bacterial abl-like genes: Production of the archaeal osmolyte N(ε)-acetyl-β-lysine by homologous overexpression of the yodP-kamA genes in bacillus subtilis. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 91(3), 689-97.

- Nakamura, S., Higashiyama, Y., Izumikawa, K., Seki, M., Kakeya, H., Yamamoto, Y., et al. (2008). The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Infect Dis.*, 61(5), 375-378.
- Nakano, M. M., Xia, L. A., & Zuber, P. (1991). Transcription initiation region of the *srfA* operon, which is controlled by the *comP-comA* signal transduction system in *bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 173(17), 5487-93.
- Ogura, M. (2016). Post-transcriptionally generated cell heterogeneity regulates biofilm formation in *bacillus subtilis*. *Genes to Cells*, 21(4), 335-349.
- Ogura, M., Liu, L., LaCelle, M., Nakano, M. M., & Zuber, P. (1999). Mutational analysis of ComS: Evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*, 32(4), 799-812.
- Ogura, M., & Tsukahara, K. (2012). SwrA regulates assembly of *bacillus subtilis* DegU via its interaction with N-terminal domain of DegU. *J Biochem.*, 151(6), 643-655.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Fujita, Y., & Tanaka, T. (2002). Whole-genome analysis of genes regulated by the *bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J Bacteriol.*, 184(9), 2344-2351.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Fujita, Y., & Tanaka, T. (2001). DNA microarray analysis of *bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: An approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.*, 29(18), 3804-3813.
- Ogura, M., Yoshikawa, H., & Chibazakura, T. (2014). Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SirR and exclusion of SinR/SirR by DegU in *bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 196(4), 873-881.
- Oldewurtel, E. R., Kouzel, N., Dewenter, L., Henseler, K., & Maier, B. (2015). Differential interaction forces govern bacterial sorting in early biofilms. *Elife*, 4, e10811.
- Osera, C., Amati, G., Calvio, C., & Galizzi, A. (2009). SwrAA activates poly- $\gamma$ -glutamate synthesis in addition to swarming in *bacillus subtilis*. *Microbiology*, 155(7), 2282-2287.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.*, 54(1), 49-79.
- Persuh M., Turgay K., Mandic-Mulec I., & Dubnau D. (1999). The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol Microbiol.*, 33(4), 886-894.
- Philippe, M., Mauël, C., & Dimitri, K. (1994). The gene of the N-acetylglucosaminidase, a *bacillus subtilis* 168 cell wall hydrolase not involved in vegetative cell autolysis. *Mol Microbiol.*, 12(4), 535-545.
- Phillips, A. M., Calvo, R. A., & Kearns, D. B. (2015). Functional activation of the flagellar type III secretion export apparatus. *PLOS Genet.*, 11(8), e1005443.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., & Qu, D. (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153(7), 2083-2092.
- Raimondo, L. M., Lundh, N. P., & Martinez, R. J. (1968). Primary adsorption site of phage PBS1: The flagellum of *bacillus subtilis*. *J Virol.*, 2(3), 256-264.
- Ramsey, M. E., Woodhams, K. L., & Dillard, J. P. (2011). The gonococcal genetic island and type IV secretion in the pathogenic *neisseria*. *Front Microbiol.*, 2, 61.
- Rashid, M. H., Tamakoshi, A., & Sekiguchi, J. (1996). Effects of *mecA* and *mecB* (*clpC*) mutations on expression of *sigD*, which encodes an alternative sigma factor, and autolysin operons and on flagellin synthesis in *bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 178(16), 4861-4869.

- Rashid, M. H., Mori, M., & Sekiguchi, J. (1995). Glucosaminidase of bacillus subtilis: Cloning, regulation, primary structure and biochemical characterization. *Microbiology*, 141(10), 2391-2404.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K., & Sonenshein, A. L. (2001). Bacillus subtilis CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.*, 15(9), 1093-1103.
- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., & Bayles, K. W. (2007). The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in staphylococcus aureus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(19), 8113-8118.
- Rösch, T. C., Golman, W., Hucklesby, L., Gonzalez-Pastor, J. E., & Graumann, P. L. (2013). The presence of conjugative plasmid pLS20 affects global transcription of its bacillus subtilis host and confers beneficial stress resistance to cells. *Appl Environ Microbiol.*, 80(4), 1349-1358.
- Rudner, D. Z., LeDeaux, J. R., Ireton, K., & Grossman, A. D. (1991). The spo0K locus of bacillus subtilis is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J Bacteriol.*, 173(4), 1388-1398.
- Samadpour, A. N., & Merrih H. (2018). DNA gyrase activity regulates DnaA-dependent replication initiation in bacillus subtilis. *Mol Microbiol.*, Feb.3.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (3rd ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(12), 5463-5467.
- Seiji, K., Katsumi, I., Mayuko, S., Yuki, S., Chojiro, K., Tohru, M., et al. (2009). Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol Microbiol.*, 73(4), 710-718.
- Serror, P., & Sonenshein, A. L. (1996). CodY is required for nutritional repression of bacillus subtilis genetic competence. *J Bacteriol.*, 178(20), 5910-5915.
- Shafikhani Sasha, H., Núñez E., & Terrance, L. (2004). Hpr (ScoC) and the phosphorelay couple cell cycle and sporulation in bacillus subtilis. *FEMS Microbiol Lett.*, 231(1), 99-110.
- Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol.*, 52(1), 81-104.
- Shea, T. B., & Seaman, E. (1984). SP3: A flagellotropic bacteriophage of bacillus subtilis. *J Gen Virol.*, 65(11), 2073-2076.
- Shingaki, R., Kasahara, Y., Inoue, T., Kokeguchi, S., & Fukui, K. (2003). Chromosome DNA fragmentation and excretion caused by defective prophage gene expression in the early-exponential-phase culture of bacillus subtilis. *Can. J. Microbio.*, 49(5), 313-325.
- Singh, P. K., Ramachandran, G., Ramos-Ruiz, R., Peiró-Pastor, R., Abia, D., Wu, L. J., et al. (2013). Mobility of the native bacillus subtilis conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling. *PLoS Genet.*, 9(10), e1003892.
- Smith, T. J., Blackman, S. A., & Foster, S. J. (2000). Autolysins of bacillus subtilis: Multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*, 146(2), 249-262.
- Smits, W. K., Eschevins, C. C., Susanna, K. A., Sierd, B., Kuipers, O. P., & Hamoen, L. W. (2005). Stripping bacillus: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Mol Microbiol.*, 56(3), 604-614.
- Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A., & Grossman, A. D. (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in bacillus subtilis. *Genes Dev.*, 9(5), 547-558.

- Solomon, J. M., & Grossman, A. D. (1996). Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.* 12(4):150-5.
- Solomon, J., Su, L., Shyn, S., & Grossman, A. D. (2003). Isolation and characterization of mutants of the bacillus subtilis oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport. *J Bacteriol.*, 185(21), 6425-6433.
- Spizizen, J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of bacillus subtilis by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 44(10), 1072-1078.
- Springael, D., Peys, K., Ryngaert, A., Roy, S. V., Hooyberghs, L., Ravatn, R., et al. (2002). Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: Indications for involvement of in situ horizontal transfer of the clc-element from inoculum to contaminant bacteria. *Environ Microbiol.* 4(2), 70-80.
- Steichen, C. T., Cho, C., Shao, J. Q., & Apicella, M. A. (2011). The neisseria gonorrhoeae biofilm matrix contains DNA, and an endogenous nuclease controls its incorporation. *Infect Immun.*, 79(4), 1504-1511.
- Steinmoen, H., Knutsen, E., & Håvarstein, L. S. (2002). Induction of natural competence in streptococcus pneumoniae triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(11), 7681-7686.
- Steinmoen, H., Teigen, A., & Håvarstein, L. S. (2003). Competence-induced cells of streptococcus pneumoniae lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J Bacteriol.*, 185(24), 7176-7183.
- Süel, G. M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L. M., & Elowitz, M. B. (2006). An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, 440(7083), 545-550.
- Svensson, S. L., Pryjma, M., & Gaynor, E. C. (2014). Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of campylobacter jejuni. *PLoS One.*, 9(8), e106063.
- Szurmant, H., & Ordal, G. W. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2), 301-319.
- Takahashi, I. (1962). Genetic transformation of bacillus subtilis by extracellular DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 7, 467-470.
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T. R., Revsbech, N. P., & Meyer, R. L. (2013). Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: A quantitative study. *FEMS Microbiol Ecol.*, 86(3), 394-403.
- Tasaki, S., Nakayama, M., & Shoji, W. (2017). Self-organization of bacterial communities against environmental pH variation: Controlled chemotactic motility arranges cell population structures in biofilms. *Plos One*, 12(3), e0173195.
- Thomas, V. C., Thurlow, L. R., Boyle, D., & Hancock, L. E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by enterococcus faecalis extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol.*, 190(16), 5690-5698.
- Tomasz, A. (1966). Model for the mechanism controlling the expression of competent state in pneumococcus cultures. *J Bacteriol.*, 91(3), 1050-1061.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 80(1), 7-12.
- Turgay K., Marjan, P., Jeanette, H., & David, D. (2001). Roles of the two ClpC ATP binding sites in the regulation of competence and the stress response. *Mol Microbiol.*, 42(3), 717-727.

- van Gestel, J., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2015). From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol.*, 13(4), e1002141.
- van Gestel, J., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2015). New tools for comparing microscopy images: Quantitative analysis of cell types in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 197(4), 699-709.
- Veening J. W., Smits W. K., Hamoen L. W., & Kuipers O. P. (2006). Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. *J Appl Microbiol.*, 101(3), 531-541.
- Verhamme Daniël T., Kiley, T. B., & Stanley-Wall, N. R. (2007). DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*, 65(2), 554-568.
- Vidakovic, L., Singh, P. K., Hartmann, R., Nadell, C. D., & Drescher, K. (2017). Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nat Microbiol.*, 3(1), 26-31.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol.*, 11(3), 157-168.
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.*, 22(7), 945-953.
- Wach, A. (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, 12(3), 259-265.
- Wang, D., Yu, J. M., Dorosky, R. J., Pierson, L. S., & Pierson, E. A. (2016). The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *PLoS One.*, 11(1), e0148003.
- Wang, X., Meng, S., & Han, J. (2017). Morphologies and phenotypes in *Bacillus subtilis* biofilms. *J Microbiol.*, 55(8), 619-627.
- Ward, M. J., Lew, H., & Zusman, D. R. (2000). Disruption of *aldA* influences the developmental process in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.*, 182(2), 546-550.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
- Wiggs, J. L., Gilman, M. Z., & Chamberlin, M. J. (1981). Heterogeneity of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*: Evidence for an additional sigma factor in vegetative cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 78(5), 2762-6.
- Wilking, J. N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M. P., & Weitz, D. A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(3), 848-852.
- Woolridge, D. P., Martinez, J. D., Stringer, D. E., & Gerner, E. W. (1999). Characterization of a novel spermidine/spermine acetyltransferase, BldD, from *Bacillus subtilis*. *Biochem J.*, 340(3), 753-758.
- Zafra, O., Lamprecht-Grandío, M., de Figueras, C. G., & González-Pastor, J. E. (2012). Extracellular DNA release by undomesticated *Bacillus subtilis* is regulated by early competence. *PLoS One*, 7(11), e48716.
- Zalieckas, J. M., Wray, J. L. V., Ferson, A. E., & Fisher, S. H. (1998). Transcription-repair coupling factor is involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *hut* and *gnt* operons. *Mol Microbiol.*, 27(5), 1031-1038.
- Zhang, C., Li, B., Tang, J. Y., Wang, X. L., Qin, Z., & Feng, X. Q. (2017). Experimental and theoretical studies on the morphogenesis of bacterial biofilms. *Soft Matter.*, 13(40), 7389-7397.
- Zhang, X. Z., & Zhang, Y. (2011). Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol.*, 4(1), 98-105.

# ANEXOS



## ANEXO I

Tabla 9: Microorganismos productores de eDNA

Microorganism	Mechanisms of eDNA release	References
<b>Gram-negative bacteria</b>		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	lysis	Palmen et al. 1995
<i>Campylobacter jejuni</i>	autolysis	Svensson et al. 2014
<i>Caulobacter crescentus</i>	lysis	Berne et al. 2010
<i>Haemophilus influenzae</i>	unknown	Izano et al. 2009
<i>Helicobacter pylori</i>	vesicles	Grande et al. 2015
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	type IV	Hamilton et al. 2005
<i>Neisseria meningitidis</i>	lysis	Lappan et al. 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	vesicles/prophage	Kadurugamuwa et al. 1996; Allesen-Holm et al. 2006
<i>Pseudomonas chlororephus</i>	autolysis	Wang et al. 2016
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	unknown	Catlin et al. 1958
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	lysis	Stewart et al. 1983
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	unknown	Watanabe et al. 1998
<i>Shewanella oneidensis</i>	autolysis	Gödeke et al. 2011
<i>Vibrio costicola</i>	unknown	Smithies et al. 1955
<i>Xanthomonas citri</i>	unknown	Sena-Vélez et al. 2016
<b>Gram-positive bacteria</b>		
<i>Bacillus cereus</i>	unknown	Vilain et al. 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	lytic-independent mechanism	Takahashi et al. 1962; Zafra et al. 2012
<i>Deinococcus radiodurans</i>	unknown	Boling et al. 1966
<i>Enterococcus faecalis</i>	fratricidal-mechanism of autolysis	Thomas et al. 2008 and 2009
<i>Lysteria monocytogenes</i>	unknown	Harmsen et al. 2010
<i>Micrococcus halodenitrificans</i>	unknown	Smithies et al. 1955
<i>Micrococcus sodonensis</i>	unknown	Campbell et al. 1961
<i>Mycobacterium avium</i>	unknown	Rose et al. 2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	autolysis	Rice et al. 2007
<i>Staphylococcus epidermis</i>	autolysis	Qin et al. 2007
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	lytic-independent mechanism	Rajendran et al. 2015
<i>Streptococcus gordonii</i>	lytic-independent mechanism modulated by competence	Kreth et al. 2009, Jack et al. 2015
<i>Streptococcus intermedius</i>	unknown	Petersen et al. 2004; Nur et al. 2013
<i>Streptococcus mutans</i>	vesicles	Liao et al. 2014

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	competence-induced lysis	Steinmoen et al. 2002
<i>Streptococcus sanguinis</i>	lytic-independent mechanism	Kreth et al. 2009
<b>Archaea</b>		
<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	unknown	Fröls et al. 2012
<i>Haloferax volcanii</i>	unknown	Fröls et al. 2012
<i>Thermococcus</i> spp.	vesicles/unknown	Soler et al. 2008
<i>Thermococcus onnurineus</i>	vesicles	Choi et al. 2015
<b>Eukaryotes</b>		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	autolysis	Mennink-Kersten et al. 2006
<i>Candida albicans</i>	unknown	Kasai et al. 2006

## ANEXO II

**Tabla 10: Genes inhibidos en el mutante 3610  $\Delta comS::spc$  a las 5:30 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) menor o igual a -1,8 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
-1,88	0,13	<i>appF</i>	Transportador ABC
-2,52	0,19	<i>argD</i>	Metabolismo aminoácidos
-1,83	0,31	<i>argG</i>	Síntesis succinato
-2,27	0,37	<i>argJ</i>	Biosíntesis arginina
-3,77	0,25	<i>atpE</i>	ATP sintetasa
-1,82	0,04	<i>azlC</i>	Transporte de aminoácidos
-2,04	0,01	<i>bltD</i>	Metabolismo aminoácidos
-2,72	0,27	<i>carA</i>	Biosíntesis arginina
-2,02	0,12	<i>carB</i>	Biosíntesis arginina
-1,87	0,13	<i>cgeD</i>	Maduración espora
-1,99	0,11	<i>cgeE</i>	Maduración espora
-10,86	0,03	<i>comS</i>	Competencia
-1,83	0,04	<i>cotA</i>	Formación de la espora
-1,81	0,07	<i>cotW</i>	Formación de la espora
-3,29	0,01	<i>cheA</i>	chemotaxis
-2,64	0,01	<i>cheB</i>	chemotaxis
-2,03	0,14	<i>cheC</i>	chemotaxis
-2,78	0,02	<i>cheD</i>	chemotaxis
-2,23	0,09	<i>cheW</i>	chemotaxis
-1,95	0,08	<i>dnaE</i>	DNA polymerase III (replicación)
-1,82	0,27	<i>flgM</i>	Motilidad
-2,01	0,11	<i>flhF</i>	Motilidad
-2,99	0,04	<i>flhP</i>	Motilidad
-1,87	0,18	<i>fliD</i>	Motilidad
-1,97	0,07	<i>fliG</i>	Motilidad
-2,65	0,06	<i>fliI</i>	Motilidad
-1,91	0,09	<i>fliJ</i>	Motilidad
-3,11	0,02	<i>fliK</i>	Motilidad
-2,81	0,01	<i>fliM</i>	Motilidad
-1,84	0,12	<i>fliS</i>	Motilidad
-1,95	0,03	<i>gatA</i>	tRNA sintetasa
-1,83	0,01	<i>gerPF</i>	Germinación espora
-2,41	0,03	<i>infA</i>	Factor inicio traducción IF-I

<b>-2,06</b>	0,03	<b><i>infC</i></b>	Factor inicio traducción IF-3
<b>-2,58</b>	0,04	<b><i>kipA</i></b>	Antagonista de Kipl - esporulación
<b>-4,23</b>	0,19	<b><i>kipl</i></b>	Inhibe KinA - esporulation
<b>-1,90</b>	0,35	<b><i>leuA</i></b>	Metabolismo aminoácidos
<b>-3,14</b>	0,06	<b><i>lytD</i></b>	N-acetylglucosaminidasa (autolisina)
<b>-2,16</b>	0,04	<b><i>map</i></b>	Modificación de proteínas
<b>-1,87</b>	0,31	<b><i>mcpB</i></b>	Motilidad y chemotaxis
<b>-2,03</b>	0,24	<b><i>motA</i></b>	Motilidad
<b>-1,85</b>	0,05	<b><i>nadC</i></b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
<b>-4,31</b>	0,30	<b><i>nadE</i></b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
<b>-2,39</b>	0,16	<b><i>nasC</i></b>	Metabolismo aminoácidos
<b>-2,40</b>	0,36	<b><i>nrgB</i></b>	Metabolismo aminoácidos
<b>-3,36</b>	0,18	<b><i>nusA</i></b>	Terminación de la transcripción
<b>-2,00</b>	0,01	<b><i>oppF</i></b>	Oligopéptido permeasa (Opp)
<b>-2,11</b>	0,03	<b><i>opuBA</i></b>	trnasportador ABC de colina
<b>-3,11</b>	0,01	<b><i>opuCC</i></b>	trnasportador ABC de colina
<b>-2,31</b>	0,05	<b><i>opuCD</i></b>	trnasportador ABC de colina
<b>-2,09</b>	0,28	<b><i>ppsC</i></b>	Producción de antibiótico
<b>-2,34</b>	0,07	<b><i>proB</i></b>	Metabolismo aminoácidos
<b>-2,10</b>	0,02	<b><i>prpC</i></b>	Modificación de proteínas (fosfatasa)
<b>-2,12</b>	0,12	<b><i>prs</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos
<b>-1,85</b>	0,02	<b><i>pucB</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (degradación purinas)
<b>-2,05</b>	0,37	<b><i>purB</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-2,05</b>	0,43	<b><i>purC</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-2,02</b>	0,14	<b><i>purH</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-3,15</b>	0,12	<b><i>purL</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-2,33</b>	0,45	<b><i>purM</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-3,73</b>	0,16	<b><i>purN</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-3,92</b>	0,13	<b><i>purS</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-1,83</b>	0,28	<b><i>purT</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis purinas)
<b>-3,02</b>	0,03	<b><i>pyrAA</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis pirimidinas)
<b>-1,94</b>	0,34	<b><i>pyrAB</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis pirimidinas)

-2,31	0,01	<i>pyrB</i>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis pirimidinas)
-2,15	0,08	<i>pyrF</i>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis pirimidinas)
-2,36	0,09	<i>pyrH</i>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis pirimidinas)
-1,82	0,10	<i>rnhB</i>	ribonucleasa HII (replicación)
-2,23	0,02	<i>rplB</i>	Proteína ribosomal
-2,36	0,02	<i>rplD</i>	Proteína ribosomal
-1,84	0,14	<i>rplF</i>	Proteína ribosomal
-2,28	0,04	<i>rplN</i>	Proteína ribosomal
-2,07	0,08	<i>rplO</i>	Proteína ribosomal
-2,24	0,03	<i>rplP</i>	Proteína ribosomal
-2,51	0,03	<i>rplR</i>	Proteína ribosomal
-2,04	0,03	<i>rplV</i>	Proteína ribosomal
-2,03	0,09	<i>rplX</i>	Proteína ribosomal
-2,09	0,13	<i>rpmJ</i>	Proteína ribosomal
-1,87	0,18	<i>rpsC</i>	Proteína ribosomal
-1,91	0,15	<i>rpsH</i>	Proteína ribosomal
-2,39	0,03	<i>rpsJ</i>	Proteína ribosomal
-1,81	0,25	<i>rpsS</i>	Proteína ribosomal
-1,86	0,07	<i>rsbP</i>	Proteína ribosomal
-2,64	0,01	<i>secY</i>	Secreción de proteínas
-2,68	0,10	<i>sigD</i>	Motilidad - Factor de transcripción
-1,89	0,04	<i>sipT</i>	Secreción de proteínas
-3,61	0,06	<i>spoIVCA</i>	DNA recombinasasa - esporulación
-6,93	0,07	<i>srfAC</i>	Producción de surfactina
-2,06	0,06	<i>srfAD</i>	Producción de surfactina
-1,87	0,01	<i>tagF</i>	Pared celular
-1,99	0,03	<i>tgt</i>	tRNA-guanina transglicosilasaFinal del formulario
-2,92	0,11	<i>tlpB</i>	Motilidad y chemotaxis
-2,09	0,19	<i>tlpC</i>	Motilidad y chemotaxis
-2,12	0,05	<i>trpA</i>	Metabolismo de aminoácidos - biosíntesis triptófano
-1,82	0,09	<i>trpB</i>	Metabolismo de aminoácidos - biosíntesis triptófano
-1,90	0,26	<i>trpS</i>	Aminoacil-tRNA sintetasa
-2,01	0,07	<i>udk</i>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos
-2,33	0,10	<i>yacO</i>	Desconocido
-2,72	0,01	<i>ybfH</i>	Desconocido
-2,29	0,04	<i>yccC</i>	Metabolismo de aminoácidos

<b>-13,48</b>	0,04	<b><i>ycgJ</i></b>	Desconocido
<b>-1,93</b>	0,10	<b><i>yclH</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,34</b>	0,07	<b><i>ycnB</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,40</b>	0,13	<b><i>ycsF</i></b>	Detoxificación
<b>-2,08</b>	0,06	<b><i>ycsi</i></b>	Desconocido
<b>-2,21</b>	0,14	<b><i>ydjH</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,01</b>	0,09	<b><i>yerD</i></b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>-2,40</b>	0,33	<b><i>yesR</i></b>	Desconocido
<b>-1,81</b>	0,16	<b><i>yesY</i></b>	Desconocido
<b>-2,01</b>	0,12	<b><i>yetM</i></b>	Detoxificación
<b>-1,98</b>	0,08	<b><i>yfhC</i></b>	Desconocido
<b>-1,94</b>	0,07	<b><i>yfiX</i></b>	Desconocido
<b>-2,32</b>	0,15	<b><i>yfkE</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,26</b>	0,09	<b><i>yfmS</i></b>	Motilidad y chemotaxis
<b>-2,38</b>	0,05	<b><i>yfmT</i></b>	Metabolismo
<b>-1,99</b>	0,04	<b><i>yhcA</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,22</b>	0,15	<b><i>yhcH</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-1,85</b>	0,25	<b><i>yhdH</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-1,90</b>	0,19	<b><i>yhfl</i></b>	Desconocido
<b>-1,81</b>	0,37	<b><i>yjbM</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos
<b>-2,42</b>	0,02	<b><i>yjgC</i></b>	Bioenergética de la membrana
<b>-2,30</b>	0,07	<b><i>yjIC</i></b>	Desconocido
<b>-2,77</b>	0,14	<b><i>ykoW</i></b>	Desconocido
<b>-2,22</b>	0,18	<b><i>ykrY</i></b>	Desconocido
<b>-1,95</b>	0,10	<b><i>ykuN</i></b>	Bioenergética de la membrana
<b>-1,89</b>	0,17	<b><i>ykuP</i></b>	Bioenergética de la membrana
<b>-3,20</b>	0,02	<b><i>ykvK</i></b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
<b>-3,81</b>	0,02	<b><i>ykvM</i></b>	Desconocido
<b>-1,98</b>	0,06	<b><i>yloM</i></b>	Modificación del RNA
<b>-2,36</b>	0,09	<b><i>ylqB</i></b>	Desconocido
<b>-1,81</b>	0,18	<b><i>ylqH</i></b>	Motilidad y chemotaxis
<b>-2,01</b>	0,05	<b><i>ylxA</i></b>	Desconocido
<b>-3,69</b>	0,01	<b><i>ylxG</i></b>	Motilidad y chemotaxis
<b>-2,83</b>	0,09	<b><i>ylxL</i></b>	Motilidad y chemotaxis
<b>-2,71</b>	0,01	<b><i>yocH</i></b>	Pared celular
<b>-1,87</b>	0,04	<b><i>yokF</i></b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos
<b>-1,98</b>	0,13	<b><i>yqeI</i></b>	Desconocido
<b>-2,57</b>	0,04	<b><i>yqeK</i></b>	Desconocido
<b>-1,94</b>	0,22	<b><i>yqiZ</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas

-2,03	0,02	<i>yrhG</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-1,97	0,01	<i>yrzE</i>	Desconocido
-2,96	0,04	<i>ytlQ</i>	Desconocido
-1,96	0,15	<i>ytlR</i>	Desconocido
-1,91	0,35	<i>yufK</i>	Desconocido
-1,94	0,07	<i>yufO</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-1,88	0,11	<i>yurP</i>	Metabolismo de aminoácidos
-1,91	0,21	<i>yuxK</i>	Desconocido
-2,17	0,15	<i>yveM</i>	Adaptación a condiciones atípicas
-1,86	0,12	<i>yvfA</i>	Desconocido
-3,04	0,18	<i>yviE</i>	Desconocido
-1,85	0,08	<i>yviF</i>	Desconocido
-2,04	0,14	<i>yvyC</i>	Motilidad y chemotaxis
-1,85	0,20	<i>yvyG</i>	Motilidad y chemotaxis
-1,97	0,07	<i>ywbM</i>	Desconocido
-2,30	0,01	<i>ywjF</i>	Bioenergética de la membrana
-1,99	0,05	<i>ywmE</i>	Desconocido
-2,20	0,01	<i>yxiF</i>	Desconocido
-2,71	0,11	<i>yxiH</i>	Desconocido
-2,20	0,02	<i>yxzC</i>	Desconocido
-1,81	0,19	<i>yycl</i>	Desconocido

**Tabla 11: Genes inducidos en el mutante 3610  $\Delta comS::spc$  a las 5:30 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) mayor o igual a 1,8 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
3,67	0,29	<i>acsA</i>	Acetil-CoA sintetasa
2,15	0,01	<i>alaT</i>	Metabolismo de aminoácidos (alanina transaminasa)
7,28	0,11	<i>albA</i>	Bacteriocina antilisterial - Producción antibióticos
2,27	0,04	<i>albB</i>	Bacteriocina antilisterial - Producción antibióticos
4,61	0,14	<i>albD</i>	Bacteriocina antilisterial - Producción antibióticos
6,25	0,18	<i>albE</i>	Bacteriocina antilisterial - Producción antibióticos
3,95	0,14	<i>albF</i>	Bacteriocina antilisterial - Producción antibióticos
1,96	0,19	<i>alsD</i>	Biosíntesis acetoina
2,25	0,02	<i>amyC</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,96	0,15	<i>aprE</i>	Metabolismo de aminoácidos (proteasa alcalina)
2,16	0,09	<i>ask</i>	Metabolismo de aminoácidos

<b>3,12</b>	0,11	<b>bglA</b>	6-fosfo-beta-glucosidasa
<b>4,62</b>	0,10	<b>bglC</b>	Metabolismo celulosa
<b>2,52</b>	0,27	<b>csn</b>	Quitosanasa - metabolismo
<b>2,30</b>	0,02	<b>ctaA</b>	Membrane bioenergetics
<b>2,16</b>	0,12	<b>cypX</b>	Detoxificación
<b>1,83</b>	0,12	<b>fruA</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>4,26</b>	0,07	<b>ggt</b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
<b>1,82</b>	0,04	<b>glpD</b>	Metabolismo del glicerol
<b>1,84</b>	0,15	<b>gntK</b>	Metabolismo del gluconato
<b>2,38</b>	0,07	<b>groEL</b>	Proteína de choque térmico clase I - Plegamiento de proteínas
<b>2,45</b>	0,09	<b>groES</b>	Proteína de choque térmico clase I - Plegamiento de proteínas
<b>3,61</b>	0,12	<b>guaC</b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos (biosíntesis de GMP)
<b>3,03</b>	0,02	<b>hemA</b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos (biosíntesis porfirina)
<b>2,09</b>	0,02	<b>hemH</b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos (biosíntesis porfirina)
<b>1,84</b>	0,13	<b>hisA</b>	Metabolismo de aminoácidos (biosíntesis histidina)
<b>1,89</b>	0,10	<b>hisF</b>	Metabolismo de aminoácidos (biosíntesis histidina)
<b>2,18</b>	0,08	<b>hisH</b>	Metabolismo de aminoácidos (biosíntesis histidina)
<b>3,33</b>	0,13	<b>hrcA</b>	Regulación negativa de proteínas de choque térmico ( <i>dnaK</i> , <i>groESL</i> )
<b>4,13</b>	0,07	<b>katA</b>	Detoxificación (catalasa vegetativa I)
<b>2,67</b>	0,11	<b>manA</b>	Manosa-6-fosfato isomerasa
<b>2,06</b>	0,03	<b>mela</b>	alfa-D-galactosidasa galactohidrolasa
<b>4,27</b>	0,16	<b>mtIA</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>5,61</b>	0,08	<b>mtID</b>	Manitol-1-fosfato dehidrogenasa
<b>3,02</b>	0,08	<b>murB</b>	Biosíntesis de peptidoglicano
<b>2,18</b>	0,11	<b>nagP</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>2,19</b>	0,22	<b>nasE</b>	Metabolismo de aminoácidos (nitrito reductasa)
<b>2,43</b>	0,06	<b>oxdC</b>	oxalato decarboxilasa
<b>2,80</b>	0,06	<b>pel</b>	pectato liasa
<b>2,01</b>	0,05	<b>phrA</b>	Inhibidor de fosfatasa (RapA) - esporulation
<b>1,86</b>	0,19	<b>prfA</b>	Terminación de traducción
<b>4,54</b>	0,08	<b>pstA</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>4,42</b>	0,03	<b>pstC</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>2,01</b>	0,27	<b>pstS</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>2,23</b>	0,01	<b>qoxA</b>	Bioenergética de la membrana
<b>2,68</b>	0,20	<b>radC</b>	Proteína de reparación de DNA



2,86	0,10	<i>rapA</i>	Esporulación (fosfatasa)
1,81	0,20	<i>rapB</i>	Esporulación (fosfatasa)
2,00	0,09	<i>rapD</i>	Esporulación (fosfatasa)
1,90	0,04	<i>resC</i>	Bioenergética de la membrana
1,89	0,41	<i>ribR</i>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
2,55	0,02	<i>sdhA</i>	Ciclo TCA (succinato deshidrogenasa)
2,28	0,06	<i>sdhC</i>	Ciclo TCA (succinato deshidrogenasa)
2,38	0,05	<i>spsF</i>	Síntesis cubierta de la espora - esporulation
1,88	0,26	<i>ssuA</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,61	0,04	<i>ssuC</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,88	0,27	<i>ssuD</i>	Metabolismo del sulfuro
1,86	0,02	<i>thiF</i>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
1,90	0,08	<i>topA</i>	DNA topoisomerasa I
2,29	0,06	<i>tpiA</i>	Metabolismo glicólisis
1,90	0,11	<i>treP</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,93	0,02	<i>trxB</i>	Bioenergética de la membrana (thioredoxina reductasa)
3,71	0,26	<i>vpr</i>	Metabolismo de aminoácidos (serina proteasa extracelular)
2,15	0,02	<i>xsa</i>	Degradación de xilano
2,44	0,13	<i>yacM</i>	Desconocido
1,82	0,17	<i>ybfO</i>	Destoxificación
1,87	0,01	<i>ycbP</i>	Desconocido
2,28	0,05	<i>yceC</i>	Destoxificación
2,11	0,10	<i>yceD</i>	Destoxificación
1,87	0,14	<i>ycnD</i>	Bioenergética de la membrana
2,03	0,10	<i>ycnE</i>	Desconocido
1,89	0,03	<i>ydiH</i>	Empaquetamiento y segregación de DNA
2,52	0,04	<i>yfiE</i>	Desconocido
1,87	0,10	<i>yfmB</i>	Desconocido
2,09	0,10	<i>yfnI</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,90	0,19	<i>yhdK</i>	Desconocido
2,59	0,01	<i>yjdF</i>	Desconocido
3,35	0,09	<i>yjiC</i>	Destoxificación
2,04	0,12	<i>yjlB</i>	Desconocido
2,75	0,14	<i>yjoB</i>	División celular
2,00	0,17	<i>ymdA</i>	Desconocido
1,88	0,16	<i>yneF</i>	Desconocido
2,53	0,19	<i>yneN</i>	Bioenergética de la membrana

3,56	0,08	<i>yoaJ</i>	Rutas específicas
2,12	0,07	<i>yoeA</i>	Desconocido
2,89	0,03	<i>ypiA</i>	Desconocido
6,19	0,09	<i>ypuA</i>	Desconocido
1,85	0,03	<i>yqcG</i>	Desconocido
1,84	0,31	<i>yqeZ</i>	Desconocido
1,95	0,03	<i>yqiG</i>	Bioenergética de la membrana
3,75	0,03	<i>yqxl</i>	Desconocido
2,95	0,10	<i>yqxJ</i>	Desconocido
1,84	0,10	<i>yral</i>	Desconocido
1,90	0,25	<i>yrhA</i>	Metabolismo de aminoácidos
2,38	0,33	<i>ytmN</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,93	0,05	<i>ytsD</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
3,35	0,18	<i>yuaF</i>	Desconocido
3,17	0,04	<i>yuaG</i>	Desconocido
2,10	0,07	<i>yueE</i>	Desconocido
1,90	0,04	<i>yugP</i>	Desconocido
2,05	0,15	<i>yvdB</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,97	0,04	<i>yvdG</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,56	0,05	<i>yvfH</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,94	0,02	<i>yvfW</i>	Desconocido
5,84	0,12	<i>yvkC</i>	Rutas específicas
1,96	0,10	<i>yvyD</i>	Iniciación de la transcription
2,92	0,19	<i>ywfB</i>	Desconocido
2,67	0,04	<i>ywfC</i>	Desconocido
1,97	0,21	<i>ywfD</i>	Rutas específicas
2,03	0,17	<i>ywfE</i>	Desconocido
2,13	0,04	<i>ywnF</i>	Desconocido
1,89	0,21	<i>ywqC</i>	Biosíntesis de polisacáridos
2,13	0,19	<i>yxcE</i>	Desconocido
2,58	0,06	<i>yxkJ</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,18	0,03	<i>yycG</i>	Transducción de señales

**Tabla 12: Genes inhibidos en el mutante 3610  $\Delta comS::spc$  a las 6 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) menor o igual a -1,8 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
-2,07	0,11	<i>aapA</i>	Permeasa aminoacidos

-1,91	0,14	<b><i>appD</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-4,38	0,38	<b><i>argD</i></b>	Biosíntesis de arginina
-4,82	0,48	<b><i>argJ</i></b>	Biosíntesis de arginina
-5,79	0,44	<b><i>carA</i></b>	Biosíntesis de arginina
-3,06	0,23	<b><i>carB</i></b>	Biosíntesis de arginina
-2,46	0,35	<b><i>cgeD</i></b>	Maduración espora - esporulación
-2,68	0,31	<b><i>cgeE</i></b>	Maduración espora - esporulación
-2,21	0,37	<b><i>comGG</i></b>	Unión a DNA exógeno - competencia
-4,52	0,26	<b><i>comS</i></b>	Transformación / Competencia
-1,80	0,33	<b><i>cotA</i></b>	Proteína de la cubierta de la espora - esporulación
-2,03	0,39	<b><i>cotW</i></b>	Proteína de la cubierta de la espora - esporulación
-2,35	0,33	<b><i>cysC</i></b>	Metabolismo de aminoácidos
-2,30	0,40	<b><i>cysS</i></b>	Aminoacil-tRNA sintetasa
-2,43	0,12	<b><i>cheA</i></b>	chemotaxis
-2,69	0,14	<b><i>cheB</i></b>	chemotaxis
-2,03	0,23	<b><i>cheC</i></b>	chemotaxis
-2,84	0,13	<b><i>cheD</i></b>	chemotaxis
-2,88	0,03	<b><i>cheW</i></b>	chemotaxis
-2,57	0,35	<b><i>cheY</i></b>	chemotaxis
-2,05	0,08	<b><i>dltB</i></b>	Biosíntesis de ácido lipoteicoico
-2,02	0,09	<b><i>fabG</i></b>	Metabolismo de lípidos
-1,81	0,07	<b><i>flgE</i></b>	Motilidad
-2,15	0,44	<b><i>flgK</i></b>	Motilidad
-2,65	0,33	<b><i>flgM</i></b>	Motilidad
-2,02	0,19	<b><i>flhB</i></b>	Motilidad
-2,73	0,16	<b><i>flhF</i></b>	Motilidad
-1,98	0,25	<b><i>flhO</i></b>	Motilidad
-2,84	0,40	<b><i>flhP</i></b>	Motilidad
-1,85	0,30	<b><i>fliD</i></b>	Motilidad
-1,97	0,49	<b><i>fliI</i></b>	Motilidad
-2,01	0,43	<b><i>fliJ</i></b>	Motilidad
-2,74	0,34	<b><i>fliK</i></b>	Motilidad
-2,53	0,23	<b><i>fliM</i></b>	Motilidad
-1,81	0,33	<b><i>fliR</i></b>	Motilidad
-2,42	0,20	<b><i>fliS</i></b>	Motilidad
-2,02	0,22	<b><i>fusA</i></b>	Factor de elongación G - traducción
-1,93	0,01	<b><i>glnR</i></b>	Regulador transcripcional de glnA
-1,87	0,25	<b><i>glyQ</i></b>	Aminoacil-tRNA sintetasa
-2,49	0,41	<b><i>gyrB</i></b>	DNA girasa - iniciación de la replicación y

			elongación del DNA
-2,43	0,10	<i>hag</i>	Motilidad
-2,07	0,14	<i>infA</i>	Factor de iniciación IF-I - traducción
-1,90	0,28	<i>infC</i>	Factor de iniciación IF-3 - traducción
-3,12	0,29	<i>kipA</i>	Antagonista de Kipl - esporulación
-2,09	0,10	<i>leuS</i>	Aminoacil-tRNA sintetasa
-2,12	0,07	<i>lytA</i>	Autolisina - secreción de proteínas
-2,91	0,37	<i>lytD</i>	Autolisina - pared celular
-1,88	0,25	<i>map</i>	Methionine aminopeptidasa - modificación de proteínas
-1,96	0,45	<i>mcpA</i>	Motilidad y quemotaxis
-2,99	0,43	<i>mcpB</i>	Motilidad y quemotaxis
-1,86	0,25	<i>minC</i>	Inhibidor división celular
-2,10	0,35	<i>motA</i>	Motilidad
-2,26	0,20	<i>mraY</i>	Biosíntesis de peptidoglicano
-1,86	0,26	<i>murD</i>	Biosíntesis de peptidoglicano
-3,71	0,39	<i>nasC</i>	Metabolismo de aminoácidos
-1,81	0,14	<i>ndhF</i>	Bioenergética de la membrana
-1,87	0,01	<i>oppF</i>	Transportador oligopéptido permeasa
-2,80	0,06	<i>opuCC</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-1,85	0,28	<i>pheT</i>	Aminoacil-tRNA sintetasa
-2,33	0,11	<i>pnpA</i>	Competencia - metabolismo de nucleótidos y ácido nucleicos (PNPasa)
-1,96	0,38	<i>prkC</i>	Proteína kinasa
-2,09	0,24	<i>prs</i>	Biosíntesis de nucleótidos
-4,74	0,46	<i>pucC</i>	Biosíntesis de purina
-1,86	0,17	<i>pucK</i>	Biosíntesis de purina
-3,18	0,45	<i>purB</i>	Biosíntesis de purina
-3,62	0,44	<i>purC</i>	Biosíntesis de purina
-1,93	0,46	<i>purH</i>	Biosíntesis de purina
-3,97	0,39	<i>purL</i>	Biosíntesis de purina
-3,89	0,44	<i>purM</i>	Biosíntesis de purina
-3,75	0,46	<i>purN</i>	Biosíntesis de purina
-1,92	0,38	<i>purQ</i>	Biosíntesis de purina
-4,35	0,41	<i>purS</i>	Biosíntesis de purina
-2,11	0,04	<i>pyrAA</i>	Biosíntesis de pirimidina
-2,15	0,18	<i>pyrAB</i>	Biosíntesis de pirimidina
-1,83	0,01	<i>pyrB</i>	Biosíntesis de pirimidina
-1,81	0,10	<i>pyrC</i>	Biosíntesis de pirimidina

-2,25	0,35	<i>pyrF</i>	Biosíntesis de pirimidina
-1,86	0,33	<i>pyrH</i>	Biosíntesis de pirimidina
-1,92	0,12	<i>rnhB</i>	ribonucleasa HII - Replicación DNA
-2,21	0,30	<i>rplD</i>	Proteínas ribosomales
-1,87	0,34	<i>rplN</i>	Proteínas ribosomales
-1,86	0,15	<i>rplO</i>	Proteínas ribosomales
-1,83	0,16	<i>rplR</i>	Proteínas ribosomales
-2,32	0,22	<i>rpmJ</i>	Proteínas ribosomales
-1,81	0,17	<i>rpsC</i>	Proteínas ribosomales
-1,93	0,02	<i>rpsG</i>	Proteínas ribosomales
-2,45	0,09	<i>rpsJ</i>	Proteínas ribosomales
-1,82	0,21	<i>rpsK</i>	Proteínas ribosomales
-2,03	0,06	<i>rpsM</i>	Proteínas ribosomales
-2,02	0,24	<i>rpsN</i>	Proteínas ribosomales
-3,03	0,33	<i>rpsS</i>	Proteínas ribosomales
-2,33	0,10	<i>secY</i>	Secreción de proteínas
-1,86	0,02	<i>serS</i>	Aminoacil-tRNA sintetasa
-2,88	0,18	<i>sigD</i>	Motilidad y chemotaxis - Factor de transcripción
-2,13	0,01	<i>tagF</i>	Biosíntesis de ácido teichoico - pared celular
-2,19	0,38	<i>xpt</i>	Biosíntesis de purina
-2,20	0,46	<i>yacO</i>	Desconocido
-2,19	0,24	<i>ybfH</i>	Desconocido
-1,96	0,36	<i>ybxF</i>	Proteína ribosomal
-3,15	0,17	<i>yccC</i>	Metabolismo de aminoácidos
-18,88	0,11	<i>ycgJ</i>	Desconocido
-1,86	0,40	<i>ycgM</i>	Metabolismo de aminoácidos
-3,05	0,43	<i>ycsF</i>	Detoxificación
-2,87	0,20	<i>yctI</i>	Desconocido
-2,01	0,05	<i>ydeG</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-2,01	0,33	<i>ydfR</i>	Desconocido
-2,48	0,25	<i>ydgH</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-1,94	0,11	<i>yerH</i>	Desconocido
-1,93	0,28	<i>yfhK</i>	División celular
-1,93	0,42	<i>yfmS</i>	Motilidad y quemotaxis
-2,00	0,44	<i>yfmT</i>	Metabolismo
-2,03	0,07	<i>yhcA</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-1,85	0,41	<i>yhfS</i>	Metabolismo de lípidos
-2,24	0,28	<i>yjgC</i>	Bioenergética de la membrana
-1,81	0,23	<i>yjIC</i>	Desconocido

<b>-3,67</b>	0,48	<b>ykrW</b>	Desconocido
<b>-3,39</b>	0,41	<b>ykrY</b>	Desconocido
<b>-2,04</b>	0,46	<b>ykuN</b>	Bioenergética de la membrana
<b>-2,31</b>	0,43	<b>ykuO</b>	Desconocido
<b>-2,29</b>	0,34	<b>ykuP</b>	Bioenergética de la membrana
<b>-2,11</b>	0,27	<b>ykvK</b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
<b>-3,66</b>	0,26	<b>ykvM</b>	Desconocido
<b>-1,83</b>	0,19	<b>ylaB</b>	Desconocido
<b>-2,17</b>	0,43	<b>ylnD</b>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
<b>-1,81</b>	0,44	<b>ylnE</b>	Desconocido
<b>-1,85</b>	0,43	<b>yloM</b>	Modificación del RNA
<b>-2,02</b>	0,12	<b>yloV</b>	Desconocido
<b>-2,18</b>	0,32	<b>ylqB</b>	Desconocido
<b>-2,34</b>	0,24	<b>ylqG</b>	Desconocido
<b>-2,85</b>	0,30	<b>ylxF</b>	Desconocido
<b>-2,95</b>	0,24	<b>ylxG</b>	Motilidad y quimiotaxis
<b>-1,96</b>	0,38	<b>ylxH</b>	Motilidad y quimiotaxis
<b>-2,44</b>	0,37	<b>ylxL</b>	Motilidad y quimiotaxis
<b>-2,13</b>	0,22	<b>ymfA</b>	Desconocido
<b>-2,72</b>	0,09	<b>yocH</b>	Pared celular
<b>-2,13</b>	0,09	<b>yokL</b>	Funciones relacionadas con progafo
<b>-2,16</b>	0,33	<b>yolA</b>	Desconocido
<b>-1,88</b>	0,17	<b>yoxC</b>	Desconocido
<b>-1,91</b>	0,15	<b>yphC</b>	Desconocido
<b>-2,31</b>	0,42	<b>yqeK</b>	Desconocido
<b>-2,14</b>	0,08	<b>yqiC</b>	Metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos
<b>-2,74</b>	0,45	<b>yqiZ</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,32</b>	0,21	<b>yrgG</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-1,85</b>	0,18	<b>yrrK</b>	Desconocido
<b>-2,00</b>	0,47	<b>yrvI</b>	Desconocido
<b>-2,24</b>	0,27	<b>yrgA</b>	Regulador transcripcional
<b>-2,33</b>	0,35	<b>yrbQ</b>	Desconocido
<b>-1,81</b>	0,33	<b>yteQ</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,49</b>	0,27	<b>ytlQ</b>	Desconocido
<b>-1,90</b>	0,46	<b>ytlR</b>	Desconocido
<b>-2,01</b>	0,23	<b>ytxB</b>	Desconocido
<b>-1,82</b>	0,20	<b>yurG</b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>-2,12</b>	0,37	<b>yurR</b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>-2,18</b>	0,21	<b>yusA</b>	Desconocido

<b>-2,14</b>	0,17	<b>yusU</b>	Desconocido
<b>-2,85</b>	0,45	<b>yveM</b>	Adaptación a condiciones atípicas
<b>-2,06</b>	0,32	<b>yviF</b>	Desconocido
<b>-2,10</b>	0,20	<b>yvqK</b>	Desconocido
<b>-2,68</b>	0,29	<b>yvyC</b>	Motilidad y quemotaxis
<b>-1,92</b>	0,29	<b>yvyF</b>	Motilidad y quemotaxis
<b>-2,71</b>	0,33	<b>yvyG</b>	Motilidad y quemotaxis
<b>-2,12</b>	0,18	<b>ywiC</b>	Desconocido
<b>-2,58</b>	0,21	<b>ywjB</b>	Desconocido
<b>-1,97</b>	0,21	<b>ywjF</b>	Bioenergética de la membrana
<b>-2,09</b>	0,36	<b>yxeM</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,29</b>	0,42	<b>yxeQ</b>	Desconocido
<b>-1,87</b>	0,24	<b>yxiF</b>	Desconocido

**Tabla 13: Genes inducidos en el mutante 3610  $\Delta$ comS::spc a las 6 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) mayor o igual a 1,8 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

<b>Fold Change</b>	<b>p-value</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>
<b>8,15</b>	0,32	<b>acsA</b>	Acetil-CoA sintetasa
<b>2,24</b>	0,37	<b>alaR</b>	Regulador transcripcional
<b>2,26</b>	0,20	<b>alaT</b>	alanine transaminase - Metabolism of amino acids and related molecules
<b>18,77</b>	0,12	<b>albA</b>	Biosíntesis de bacteriocina (antibiótico)
<b>3,31</b>	0,01	<b>albB</b>	Biosíntesis de bacteriocina (antibiótico)
<b>6,77</b>	0,02	<b>albD</b>	Biosíntesis de bacteriocina (antibiótico)
<b>15,06</b>	0,30	<b>albE</b>	Biosíntesis de bacteriocina (antibiótico)
<b>5,52</b>	0,03	<b>albF</b>	Biosíntesis de bacteriocina (antibiótico)
<b>2,81</b>	0,42	<b>alsD</b>	Biosíntesis de acetoína
<b>2,19</b>	0,01	<b>amyC</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>2,89</b>	0,08	<b>aprE</b>	Proteasa alcalina - Metabolismo de aminoácidos
<b>1,82</b>	0,37	<b>arsB</b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>3,23</b>	0,44	<b>bglA</b>	6-phospho-beta-glucosidasa
<b>3,92</b>	0,09	<b>csn</b>	Metabolismo
<b>2,10</b>	0,07	<b>ctaA</b>	Bioenergética de la membrana
<b>2,38</b>	0,06	<b>ctaD</b>	Bioenergética de la membrana
<b>1,91</b>	0,31	<b>ctaE</b>	Bioenergética de la membrana
<b>1,97</b>	0,12	<b>ctaF</b>	Bioenergética de la membrana
<b>2,03</b>	0,01	<b>dhaS</b>	Metabolismo de coenzimas y grupos protéticos

1,91	0,45	<i>gcaD</i>	Biosíntesis pared celular
1,82	0,39	<i>glpD</i>	Metabolismo del glicerol
2,62	0,13	<i>groEL</i>	Proteína de choque térmico clase I
3,47	0,30	<i>groES</i>	Proteína de choque térmico clase I
5,40	0,41	<i>guaC</i>	Biosíntesis de GMP
3,48	0,20	<i>hemA</i>	Biosíntesis de porfirina
1,81	0,12	<i>hemC</i>	Biosíntesis de porfirina
2,05	0,09	<i>hemH</i>	Biosíntesis de porfirina
5,88	0,34	<i>hrcA</i>	Factor de transcripción (inhibe <i>dnaK, groEL</i> )
5,44	0,25	<i>kataA</i>	Catalasa - detoxificación
2,25	0,02	<i>maf</i>	División celular
3,60	0,35	<i>manA</i>	Manosa-6-fosfato isomerasa
2,02	0,29	<i>mela</i>	Galactosidasa inducida por estrés
1,83	0,37	<i>metA</i>	Biosíntesis de metionina
6,52	0,48	<i>mtIA</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
13,19	0,26	<i>mtID</i>	Manitol-1-fosfato deshidrogenasa
5,54	0,08	<i>murB</i>	Biosíntesis de peptidoglicano
2,88	0,31	<i>nagP</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,07	0,18	<i>nprE</i>	Metaloproteasa extracelular
2,40	0,31	<i>oxdC</i>	Oxalato decarboxilasa
1,83	0,39	<i>pbpE</i>	Biosíntesis de peptidoglicano
2,41	0,42	<i>pel</i>	Pectato liasa
2,10	0,36	<i>pgm</i>	Metabolismo glicolítico
1,89	0,46	<i>pmi</i>	Manosa-6-fosfato isomerasa
8,46	0,24	<i>pstA</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
5,53	0,23	<i>pstC</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,56	0,48	<i>pstS</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,90	0,11	<i>qoxA</i>	Bioenergética de la membrana
1,98	0,09	<i>qoxB</i>	Bioenergética de la membrana
1,82	0,43	<i>racX</i>	Metabolismo de aminoácidos
5,88	0,31	<i>radC</i>	Reparación DNA
3,36	0,13	<i>rapA</i>	Esporulación
2,41	0,08	<i>resE</i>	Transducción de señales
2,28	0,24	<i>rsbV</i>	Adaptación a condiciones atípicas
2,30	0,23	<i>sdhA</i>	Ciclo ATC
2,34	0,01	<i>sdhC</i>	Ciclo ATC
2,60	0,10	<i>sipW</i>	Peptidasa – matriz extracelular
2,76	0,18	<i>sipV</i>	Secreción de proteínas
2,61	0,01	<i>spsF</i>	Síntesis polisacáridos espora



<b>2,09</b>	0,43	<b><i>ssuC</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>1,83</b>	0,15	<b><i>tatCY</i></b>	Secreción de proteínas
<b>2,13</b>	0,40	<b><i>tenA</i></b>	Regulador transcripcional
<b>1,81</b>	0,34	<b><i>trxA</i></b>	Bioenergética de la membrana
<b>2,06</b>	0,25	<b><i>trxB</i></b>	Bioenergética de la membrana
<b>2,05</b>	0,35	<b><i>tuaA</i></b>	Pared celular
<b>7,36</b>	0,08	<b><i>vpr</i></b>	Prteasa extracelular - metabolismo de aminoácidos
<b>1,81</b>	0,49	<b><i>xkdW</i></b>	Profago PBSX
<b>2,38</b>	0,28	<b><i>yaaO</i></b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>3,00</b>	0,16	<b><i>yacM</i></b>	Desconocido
<b>1,95</b>	0,23	<b><i>ycbP</i></b>	Desconocido
<b>2,22</b>	0,27	<b><i>yceC</i></b>	Detoxificación
<b>2,40</b>	0,19	<b><i>yceD</i></b>	Detoxificación
<b>1,86</b>	0,43	<b><i>ycnD</i></b>	Bioenergética de la membrana
<b>2,16</b>	0,40	<b><i>ycnE</i></b>	Desconocido
<b>1,84</b>	0,37	<b><i>ydbI</i></b>	Desconocido
<b>2,45</b>	0,18	<b><i>yddJ</i></b>	Desconocido
<b>2,13</b>	0,18	<b><i>ydhE</i></b>	Detoxificación
<b>2,19</b>	0,27	<b><i>ydiH</i></b>	Empaquetamiento y segregación del DNA
<b>1,88</b>	0,24	<b><i>ydjP</i></b>	Detoxificación
<b>1,80</b>	0,22	<b><i>yeel</i></b>	Desconocido
<b>2,12</b>	0,04	<b><i>yfiE</i></b>	Desconocido
<b>1,96</b>	0,50	<b><i>yfkA</i></b>	Desconocido
<b>2,10</b>	0,19	<b><i>yfkH</i></b>	Desconocido
<b>1,90</b>	0,17	<b><i>yfkl</i></b>	Desconocido
<b>2,35</b>	0,27	<b><i>yfnI</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>2,26</b>	0,23	<b><i>yhzA</i></b>	Proteína ribosomal
<b>2,72</b>	0,16	<b><i>yitT</i></b>	Desconocido
<b>4,10</b>	0,31	<b><i>yjiC</i></b>	Destoxificación
<b>3,04</b>	0,45	<b><i>yjoB</i></b>	División celular
<b>1,80</b>	0,47	<b><i>ykoY</i></b>	Destoxificación
<b>2,75</b>	0,34	<b><i>ymdA</i></b>	Desconocido
<b>2,41</b>	0,02	<b><i>yncM</i></b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>2,35</b>	0,45	<b><i>yneF</i></b>	Desconocido
<b>3,01</b>	0,36	<b><i>yoaJ</i></b>	Rutas específicas
<b>1,84</b>	0,16	<b><i>yoeA</i></b>	Desconocido
<b>1,87</b>	0,19	<b><i>yolJ</i></b>	Rutas específicas
<b>3,46</b>	0,21	<b><i>ypiA</i></b>	Desconocido
<b>6,27</b>	0,46	<b><i>ypuA</i></b>	Desconocido

2,95	0,28	<i>yqeZ</i>	Desconocido
1,83	0,33	<i>yqjG</i>	Esporulación
4,14	0,26	<i>yqxl</i>	Desconocido
4,69	0,09	<i>yqxJ</i>	Desconocido
1,83	0,50	<i>yrrM</i>	Metabolismo de coenzimas y grupos protéticos
2,12	0,37	<i>yrzC</i>	Desconocido
1,86	0,18	<i>yteR</i>	Desconocido
1,83	0,14	<i>ytkL</i>	Desconocido
2,17	0,10	<i>ytxJ</i>	Adaptación a condiciones atípicas
7,86	0,04	<i>yuaF</i>	Desconocido
4,92	0,11	<i>yuaG</i>	Desconocido
1,84	0,04	<i>yulD</i>	Desconocido
2,36	0,22	<i>yvfH</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
1,88	0,12	<i>yvfW</i>	Desconocido
1,88	0,28	<i>yvgT</i>	Desconocido
9,95	0,43	<i>yvkC</i>	Rutas específicas
2,35	0,32	<i>yvlB</i>	Desconocido
2,73	0,12	<i>ywbG</i>	Desconocido
3,91	0,05	<i>ywfB</i>	Desconocido
2,24	0,11	<i>ywfC</i>	Desconocido
1,84	0,13	<i>ywfD</i>	Rutas específicas
1,99	0,22	<i>ywmD</i>	Desconocido
2,23	0,15	<i>ywnF</i>	Desconocido
1,99	0,27	<i>ywqC</i>	Biosíntesis de polisacáridos
2,11	0,40	<i>ywsB</i>	Desconocido
2,33	0,16	<i>yxaL</i>	Modificación de proteínas
4,34	0,18	<i>yx cE</i>	Desconocido
2,43	0,30	<i>yxkI</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,04	0,16	<i>yycG</i>	Transducción de señales
4,72	0,40	<i>yyzE</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas

**Tabla 14: Genes inhibidos en el mutante 3610  $\Delta swrA::tet$  a las 5 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) menor o igual a -2,0 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
-2,80	0,08	<i>cheY</i>	Motilidad y chemotaxis
-2,04	0,04	<i>flgC</i>	Motilidad
-2,45	0,10	<i>flhB</i>	Motilidad

-2,36	0,26	<i>fliE</i>	Motilidad
-2,41	0,17	<i>fliF</i>	Motilidad
-2,49	0,01	<i>fliG</i>	Motilidad
-2,02	0,13	<i>fliH</i>	Motilidad
-2,42	0,24	<i>fliI</i>	Motilidad
-2,48	0,25	<i>fliK</i>	Motilidad
-2,16	0,16	<i>fliR</i>	Motilidad
-2,42	0,13	<i>fliZ</i>	Motilidad
-2,03	0,35	<i>hemAT</i>	Motilidad
-2,28	0,21	<i>gerAC</i>	Germinación - esporulación
-2,20	0,11	<i>glnA</i>	Biosíntesis de glutamina
-2,63	0,01	<i>glnR</i>	Regulador transcripcional (inhibe glnA)
-2,65	0,11	<i>kipA</i>	Esporulación - antagonista de kipI
-3,33	0,08	<i>kipI</i>	Esporulación - inhibidor de kipA
-4,90	0,03	<i>kipR</i>	Regulador transcripcional - activador del operon <i>kip</i>
-4,12	0,13	<i>maeN</i>	Trasnporte/unión de proteínas y lipoproteínas
-2,13	0,06	<i>mreBH</i>	Pared celular
-2,22	0,30	<i>nasC</i>	Nitrato reductasa - metabolismo aminoácidos
-3,05	0,11	<i>nasD</i>	Nitrato reductasa - metabolismo aminoácidos
-2,01	0,05	<i>ndhF</i>	Oxidorreductasa
-2,84	0,07	<i>nrgA</i>	Trasnporte/unión de proteínas y lipoproteínas
-4,03	0,01	<i>nrgB</i>	Metabolismo de aminoácidos
-2,62	0,22	<i>pucC</i>	Degradación de purinas
-2,90	0,13	<i>pucI</i>	Degradación de purinas
-4,46	0,01	<i>pucK</i>	Degradación de purinas
-4,32	0,03	<i>pucL</i>	Degradación de purinas
-2,02	0,29	<i>pucR</i>	Regulador transcripcional de los genes <i>puc</i>
-10,91	0,03	<i>spoIVCA</i>	DNA recombinasa
-3,96	0,17	<i>ureB</i>	Metabolismo de aminoácidos
-2,87	0,21	<i>yaaH</i>	Germinación - esporulación
-2,72	0,04	<i>ycsF</i>	Detoxificación
-2,43	0,46	<i>ycsG</i>	Desconocido
-4,45	0,12	<i>ycsI</i>	Desconocido
-3,81	0,09	<i>ycsK / lipC</i>	Germinación - esporulación
-2,96	0,15	<i>yddQ</i>	Metabolismo
-4,27	0,24	<i>ydeH</i>	Desconocido
-2,39	0,02	<i>ydhF</i>	Desconocido
-2,00	0,07	<i>yfiQ</i>	Desconocido

-2,15	0,17	<i>yhfD</i>	Desconocido
-3,19	0,34	<i>ykoW</i>	Transducción de señales
-3,35	0,25	<i>ylxF</i>	Motilidad
-4,62	0,05	<i>ylxG</i>	Motilidad
-2,80	0,02	<i>ylxL / swrB</i>	Motilidad - swarming
-2,35	0,09	<i>yndB</i>	Respuesta a estrés
-2,12	0,05	<i>yodE / mhqE</i>	Respuesta a estrés
-2,12	0,12	<i>yojC</i>	Desconocido
-2,07	0,04	<i>yonV</i>	Derivado de profago SPBc2
-2,15	0,19	<i>yorH</i>	Derivado de profago SPBc2
-2,74	0,03	<i>ypbG</i>	Actividad hidrolasa
-2,70	0,03	<i>ypuA</i>	Desconocido
-2,00	0,45	<i>yqdB / txpA</i>	Toxina
-2,15	0,03	<i>yqeC</i>	Oxidorreductasa
-2,40	0,08	<i>yqzF</i>	Desconocido
-2,14	0,04	<i>yrbD</i>	Trasnporte/unión de proteínas y lipoproteínas
-2,95	0,09	<i>yvfR</i>	Trasnporte/unión de proteínas y lipoproteínas
-2,81	0,06	<i>ywhL</i>	Desconocido
-2,02	0,28	<i>ywtA / capC</i>	Biosíntesis de PGA
-2,17	0,08	<i>bltD</i>	Metabolismo de aminoácidos
-3,71	0,07	<i>xkdN</i>	Profago PBSX
-2,40	0,10	<i>ygxB</i>	Esporulación
-2,44	0,03	<i>yodP</i>	Desconocido
-2,41	0,35	<i>yotG</i>	Derivado de profago SPBc2
-2,19	0,41	<i>ypfB / jofB</i>	Desconocido

**Tabla 15: Genes inducidos en el mutante 3610  $\Delta$ swrA::tet a las 5 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) mayor o igual a 2,0 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
2,88	0,11	<i>gbsA</i>	condiciones de estrés
2,03	0,07	<i>gutR</i>	regulación transcripcional sorbitol
2,18	0,15	<i>rapB</i>	Esporulación
2,11	0,49	<i>spolIIIAD</i>	Esporulación
2,64	0,01	<i>yaaL</i>	Desconocido
2,15	0,04	<i>ybdM</i>	Kinasa
3,38	0,01	<i>ycdA</i>	Lipoproteína
2,16	0,06	<i>ydcN / immR</i>	Regulador transcripcional
2,23	0,02	<i>ydcT</i>	Desconocido

2,25	0,26	<i>ydhS / gmuF</i>	Metabolismo carbohidratos
3,05	0,24	<i>yfiC</i>	Desconocido
2,02	0,01	<i>yfiD</i>	Lipoproteína
3,00	0,31	<i>yfiE</i>	Desconocido
2,49	0,03	<i>yhbF</i>	Desconocido
2,16	0,02	<i>yhiK / ntdB</i>	Biosíntesis de antibiótico
2,69	0,11	<i>yitM</i>	Desconocido
2,33	0,26	<i>yjhB</i>	Hidrolasa
2,20	0,02	<i>yobJ</i>	Membrana celular
2,13	0,38	<i>yocL</i>	Desconocido
2,94	0,30	<i>yomE</i>	Derivado de profago SPBc2
2,65	0,19	<i>yomO</i>	Derivado de profago SPBc2
4,91	0,37	<i>yopO</i>	Derivado de profago SPBc2 - regulador transcripcional
2,19	0,01	<i>yopX</i>	Derivado de profago SPBc2
2,20	0,09	<i>yorB</i>	Derivado de profago SPBc2
2,00	0,10	<i>yorC</i>	Derivado de profago SPBc2
2,39	0,42	<i>yorV</i>	Derivado de profago SPBc2
3,04	0,13	<i>yorX</i>	Derivado de profago SPBc2
2,54	0,27	<i>yosE</i>	Derivado de profago SPBc2
4,24	0,23	<i>yosF</i>	Derivado de profago SPBc2
2,57	0,01	<i>yubC / cdoA</i>	Cisteína dioxigenasa
2,26	0,31	<i>yubF</i>	Respuesta a daño en DNA
2,32	0,29	<i>yueB</i>	Sistema de secreción ESX
2,02	0,16	<i>yukA</i>	Sistema de secreción ESX
2,13	0,23	<i>yukB</i>	Sistema de secreción ESX
2,16	0,04	<i>yulE / rhaA</i>	Metabolismo
3,13	0,27	<i>yurZ</i>	Desconocido
2,71	0,05	<i>yvaW / sdpA</i>	Esporulación
2,26	0,03	<i>yvcB</i>	Desconocido
2,36	0,11	<i>yvjD / minD</i>	División celular
2,58	0,28	<i>yvmC</i>	Transferasa
2,16	0,19	<i>yvqH / liaH</i>	Metabolismo
3,33	0,12	<i>yvri / sigO</i>	RNA polimerasa
2,39	0,09	<i>ywpE</i>	Cisteína proteasa
2,00	0,46	<i>ywqH</i>	Desconocido
2,56	0,04	<i>ywqi</i>	Desconocido

**Tabla 16: Genes inhibidos en el mutante 3610  $\Delta$ swrA::tet a las 6 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) menor o igual a -2,0 y *p-value*  $\leq$  0,8. Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
-3,93	0,19	<i>bltD</i>	Metabolismo de aminoácidos
-2,15	0,07	<i>cdsA</i>	Metabolismo de lípidos
-2,75	0,44	<i>cheA</i>	Chemotaxis
-3,21	0,45	<i>cheB</i>	Chemotaxis
-2,67	0,47	<i>cheC</i>	Chemotaxis
-2,44	0,33	<i>cheD</i>	Chemotaxis
-2,95	0,18	<i>cheW</i>	Chemotaxis
-3,72	0,19	<i>comP</i>	Quorum sensing - competencia temprana
-2,04	0,23	<i>ebrB</i>	transporte/unión de proteínas
-2,90	0,46	<i>flgC</i>	Motilidad
-2,62	0,42	<i>flgM</i>	Motilidad - anti-sigma factor
-2,50	0,44	<i>flhB</i>	Motilidad
-2,54	0,46	<i>fliD</i>	Motilidad
-2,82	0,34	<i>fliE</i>	Motilidad
-2,84	0,36	<i>fliF</i>	Motilidad
-2,38	0,29	<i>fliG</i>	Motilidad
-3,12	0,48	<i>fliH</i>	Motilidad
-3,57	0,44	<i>fliI</i>	Motilidad
-3,38	0,46	<i>fliK</i>	Motilidad
-2,80	0,22	<i>fliL</i>	Motilidad
-2,65	0,34	<i>fliM</i>	Motilidad
-3,36	0,43	<i>fliR</i>	Motilidad
-2,07	0,03	<i>fliS</i>	Motilidad
-3,72	0,45	<i>fliZ</i>	Motilidad
-2,21	0,32	<i>lytD</i>	Autolisina
-2,45	0,44	<i>nucB</i>	Nucleasa - esporulación
-2,03	0,24	<i>rnhB</i>	Replicación del DNA
-2,81	0,40	<i>sigD</i>	Motilidad - factor de transcripción
-125,77	0,05	<i>spoIVB</i>	Esporulación
-2,05	0,30	<i>tagE</i>	Síntesis de ácido teicoico
-2,46	0,44	<i>tlpC</i>	Motilidad y chemotaxis
-2,47	0,46	<i>wapA</i>	Pared celular
-2,15	0,05	<i>xepA</i>	Profago PBSX
-2,12	0,15	<i>xkdF</i>	Profago PBSX
-2,33	0,45	<i>xkdJ</i>	Profago PBSX
-2,48	0,25	<i>xkdK</i>	Profago PBSX

-2,91	0,03	<i>xkdU</i>	Profago PBSX
-8,90	0,02	<i>ybbK</i>	Desconocido
-2,11	0,03	<i>ybfH</i>	Desconocido
-2,21	0,32	<i>ydhO / gmuC</i>	transporte/unión de proteínas y lipoproteínas
-2,05	0,50	<i>yhaJ</i>	Desconocido
-2,55	0,44	<i>ylaB</i>	Desconocido
-3,99	0,03	<i>ylxG</i>	Motilidad y chemotaxis
-2,92	0,48	<i>ylxH</i>	Motilidad y chemotaxis
-3,17	0,43	<i>ylxL / swrB</i>	Motilidad y chemotaxis - swarming
-2,06	0,30	<i>yokL</i>	Derivado de profago SPBc2
-2,01	0,39	<i>yqfB</i>	Desconocido
-2,42	0,04	<i>ytlQ</i>	Desconocido
-2,41	0,41	<i>yveP / epsF</i>	Biosíntesis de EPS
-2,68	0,46	<i>yveR / epsH</i>	Biosíntesis de EPS
-2,51	0,49	<i>yvfB / epsK</i>	Biosíntesis de EPS
-3,12	0,48	<i>yvfC / epsL</i>	Biosíntesis de EPS
-2,60	0,39	<i>yvyC</i>	Desconocido
-2,49	0,41	<i>yxiF</i>	Desconocido
-2,38	0,39	<i>yxiH</i>	Desconocido
-2,86	0,42	<i>yxil</i>	Desconocido
-2,05	0,46	<i>yxiJ</i>	Desconocido
-2,39	0,02	<i>yxiK</i>	Desconocido
-2,35	0,38	<i>yxiM</i>	Desconocido
-2,35	0,31	<i>yxzC</i>	Desconocido
-2,67	0,27	<i>yxzG</i>	Desconocido
-2,45	0,49	<i>yydA / rlmH</i>	rRNA metiltransferasa

**Tabla 17: Genes inducidos en el mutante 3610  $\Delta$ swrA::tet a las 6 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) mayor o igual a 2,0 y un *p-value*  $\leq 0,8$ . Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
2,74	0,06	<i>ald</i>	Metabolismo de aminoácidos - esporulación
3,13	0,45	<i>aprE</i>	Metabolismo de aminoácidos
2,05	0,34	<i>bcd</i>	Metabolismo de lípidos
2,27	0,12	<i>bpr</i>	Metabolismo de aminoácidos
2,39	0,08	<i>glmS</i>	Metabolismo de aminoácidos
2,01	0,05	<i>hmp</i>	Bioenergética de la membrana
2,01	0,06	<i>hxlB</i>	Ruta de la ribulosa monofosfato

<b>4,37</b>	0,24	<b><i>ispA</i></b>	Metabolismo de aminoácidos - serina proteasa
<b>2,01</b>	0,25	<b><i>nprE</i></b>	Metabolismo de aminoácidos - metaloproteasa extracelular
<b>2,47</b>	0,29	<b><i>pel</i></b>	Pectato liasa
<b>3,45</b>	0,10	<b><i>rapA</i></b>	Esporulación
<b>2,43</b>	0,00	<b><i>rapB</i></b>	Esporulación
<b>2,18</b>	0,14	<b><i>sodA</i></b>	Detoxificación
<b>2,28</b>	0,10	<b><i>spsF</i></b>	Síntesis de polisacáridos de la espora
<b>2,07</b>	0,02	<b><i>ureB</i></b>	Metabolismo de aminoácidos - ureasa
<b>2,23</b>	0,48	<b><i>yczJ</i></b>	Desconocido
<b>2,47</b>	0,30	<b><i>ydaF</i></b>	Acetiltransferasa
<b>2,23</b>	0,01	<b><i>yesJ</i></b>	Desconocido
<b>2,68</b>	0,33	<b><i>yfiC</i></b>	Desconocido
<b>2,51</b>	0,04	<b><i>yfkN</i></b>	Metabolismo de nucleótidos
<b>2,60</b>	0,15	<b><i>yoaJ</i></b>	Precursor de endogluconasa
<b>2,01</b>	0,48	<b><i>yqgW</i></b>	Desconocido
<b>2,08</b>	0,09	<b><i>yqxl</i></b>	Desconocido
<b>2,01</b>	0,04	<b><i>yral</i></b>	Desconocido
<b>2,09</b>	0,36	<b><i>yrvi / dtd</i></b>	Metabolismo tRNA
<b>2,22</b>	0,19	<b><i>ywfC / bacB</i></b>	Producción de antibiotico - H2HPP isomerasa
<b>2,12</b>	0,46	<b><i>ywfD / bacC</i></b>	Producción de antibiotico
<b>2,14</b>	0,23	<b><i>ywqL / nfi</i></b>	Endonucleasa V
<b>2,06</b>	0,12	<b><i>ywsB</i></b>	Desconocido

**Tabla 18: Genes inhibidos en el mutante 3610 *motAB::tet* a las 5 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) menor o igual a -2,0 y un *p-value* ≤ 0,8. Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

<b>Fold Change</b>	<b>p-value</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>
<b>-2,09</b>	0,37	<b><i>alba</i></b>	Producción de antibiótico
<b>-3,70</b>	0,22	<b><i>bglS</i></b>	Degradación liquenasa
<b>-2,25</b>	0,32	<b><i>bltD</i></b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>-2,92</b>	0,24	<b><i>comK</i></b>	Regulador competencia tardía - factor de transcripción
<b>-3,57</b>	0,45	<b><i>manR</i></b>	Regulador transcripcional del operón manosa
<b>-2,13</b>	0,09	<b><i>purN</i></b>	Biosíntesis de purinas
<b>-2,13</b>	0,35	<b><i>rbsD</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>-2,41</b>	0,30	<b><i>sboX</i></b>	Producción de antibiótico
<b>-3,37</b>	0,34	<b><i>spoIVB</i></b>	Esporulación
<b>-2,34</b>	0,20	<b><i>xhIA</i></b>	Profago PBSX



-3,58	0,43	<i>xkdD</i>	Profago PBSX
-2,27	0,12	<i>xkdG</i>	Profago PBSX
-2,70	0,19	<i>xkdH</i>	Profago PBSX
-2,04	0,07	<i>xkdI</i>	Profago PBSX
-2,08	0,36	<i>xkdJ</i>	Profago PBSX
-3,40	0,11	<i>xkdM</i>	Profago PBSX
-2,80	0,36	<i>xkdN</i>	Profago PBSX
-2,24	0,07	<i>xkdO</i>	Profago PBSX
-2,27	0,05	<i>xkdP</i>	Profago PBSX
-2,24	0,29	<i>xkdQ</i>	Profago PBSX
-2,23	0,35	<i>xkdR</i>	Profago PBSX
-3,85	0,32	<i>xkdU</i>	Profago PBSX
-2,18	0,26	<i>xtmB</i>	Profago PBSX
-2,33	0,37	<i>ydfQ</i>	Bioenergética de la membrana
-2,01	0,10	<i>ydiR</i>	Endonucleasa
-9,34	0,11	<i>yezC</i>	Regulador transcripcional
-2,78	0,10	<i>ygxB</i>	Esporulación
-5,56	0,31	<i>yjcM</i>	Desconocido
-2,36	0,17	<i>ymaD</i>	Desconocido
-2,46	0,19	<i>yodP</i>	Actividad N-acetil transferasa
-2,95	0,16	<i>yolJ / sunS</i>	derivado del profago SPBc2
-11,64	0,39	<i>yosD</i>	derivado del profago SPBc2
-2,01	0,10	<i>yotG</i>	derivado del profago SPBc2
-2,54	0,19	<i>yozB</i>	Bioenergética de la membrana
-5,52	0,01	<i>ypfB / jofB</i>	Desconocido
-3,52	0,30	<i>yrrT</i>	Metiltransferasa
-2,00	0,07	<i>yuaJ / thiT</i>	Transporte de tiamina
-3,45	0,19	<i>yvaY / sdpC</i>	Retraso de la esporulación
-4,73	0,27	<i>yvbA / sdpR</i>	Retraso de la esporulación
-3,36	0,02	<i>yvfA / epsK</i>	Síntesis EPS
-2,32	0,46	<i>yvfT</i>	Histidina kinasa
-3,75	0,45	<i>yvzD / swrAA</i>	Motilidad - swarming
-2,41	0,29	<i>yxil</i>	Desconocido
-3,21	0,10	<i>yxiK</i>	Desconocido
-2,10	0,16	<i>yxxG / wapl</i>	Proteína de inmunidad

**Tabla 19: Genes inducidos en el mutante 3610 *motAB::tet* a las 5 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) mayor o igual a 2,0 y *p-value* ≤ 0,8. Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
2,70	0,08	<i>appB</i>	Oligopeptido permeasa
3,21	0,05	<i>bcd</i>	Metabolismo de lípidos
7,36	0,05	<i>bglC</i>	Degradación de celulosa
2,49	0,08	<i>bkdAB</i>	Metabolismo de lípidos
2,43	0,11	<i>bkdB</i>	Metabolismo de lípidos
2,33	0,44	<i>cotX</i>	Esporulación - cubierta
5,32	0,02	<i>dppB</i>	Transportador de dipéptidos - esporulación
6,89	0,13	<i>dppC</i>	Transportador de dipéptidos - esporulación
2,25	0,06	<i>fabHA</i>	Metabolismo de lípidos
2,33	0,47	<i>fabHB</i>	Metabolismo de lípidos
4,60	0,18	<i>ggt</i>	Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos
4,42	0,33	<i>gspA</i>	Proteína de estrés
2,50	0,27	<i>kapD</i>	Inhibidor de KinA - esporulación
2,93	0,14	<i>katE</i>	Catalasa - detoxificación
2,03	0,33	<i>katX</i>	Catalasa - detoxificación
2,82	0,32	<i>lpdV</i>	Metabolismo de lípidos
6,76	0,09	<i>nhaX</i>	Regulador transcripcional
4,26	0,40	<i>nprE</i>	Metaloproteasa extracelular - metabolismo de aminoácidos
2,11	0,18	<i>pel</i>	Pectato liasa
2,85	0,17	<i>phy</i>	Fitasa
3,07	0,48	<i>pksG</i>	Producción de antibiótico
3,08	0,44	<i>pksI</i>	Producción de antibiótico
4,29	0,24	<i>pksL</i>	Producción de antibiótico
4,56	0,05	<i>pksM</i>	Producción de antibiótico
4,04	0,39	<i>pksN</i>	Producción de antibiótico
3,01	0,12	<i>pucC</i>	Degradación de purinas
2,90	0,14	<i>pucE</i>	Degradación de purinas
2,04	0,46	<i>puck</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
2,58	0,42	<i>pucL</i>	Degradación de purinas
4,88	0,45	<i>rapA</i>	Inhibidor de la esporulación
3,78	0,33	<i>rapB</i>	Esporulación
2,64	0,31	<i>rapF</i>	Esporulación
2,05	0,13	<i>senS</i>	Regulador transcripcional
2,66	0,19	<i>spsF</i>	Síntesis de polisacáridos de la espora

<b>2,52</b>	0,23	<b><i>srfAB</i></b>	Producción de surfactina
<b>4,10</b>	0,17	<b><i>vpr</i></b>	Proteasa - metabolismo de aminoácidos
<b>2,24</b>	0,32	<b><i>xynD</i></b>	Degradación de xilano
<b>2,26</b>	0,21	<b><i>ybbE</i></b>	Detoxificación
<b>2,09</b>	0,44	<b><i>ybcT / skfC</i></b>	Canibalismo
<b>2,23</b>	0,49	<b><i>ydaP</i></b>	Desconocida
<b>2,43</b>	0,37	<b><i>ydcT</i></b>	Desconocida
<b>2,36</b>	0,41	<b><i>ydhs / gmuF</i></b>	similar a manosa 6-fosfato isomerasa
<b>2,08</b>	0,36	<b><i>yfhL</i></b>	Desconocida
<b>4,10</b>	0,01	<b><i>yfiC</i></b>	Desconocida
<b>2,53</b>	0,36	<b><i>yfiD</i></b>	Lipoproteína
<b>2,57</b>	0,09	<b><i>yfiE</i></b>	Desconocida
<b>4,66</b>	0,26	<b><i>yfkN</i></b>	Metabolismo de nucleótidos
<b>3,32</b>	0,24	<b><i>ygaK</i></b>	Oxidorreductasa
<b>2,17</b>	0,10	<b><i>yhcS</i></b>	Desconocida
<b>2,20</b>	0,07	<b><i>yhdF</i></b>	Oxidorreductasa
<b>2,07</b>	0,27	<b><i>yisT</i></b>	Restricción / modificación y reparación del DNA
<b>12,25</b>	0,12	<b><i>yitM</i></b>	Desconocida
<b>2,70</b>	0,44	<b><i>yjiC</i></b>	Detoxificación
<b>4,48</b>	0,13	<b><i>ykfA</i></b>	Degradación de pared celular
<b>5,29</b>	0,44	<b><i>ylaE</i></b>	Desconocida
<b>4,94</b>	0,20	<b><i>yoaI</i></b>	Expansina
<b>3,14</b>	0,13	<b><i>yocB</i></b>	Desconocida
<b>2,11</b>	0,20	<b><i>yocK</i></b>	Proteína de estrés
<b>2,26</b>	0,33	<b><i>yogA</i></b>	Oxidorreductasa
<b>2,15</b>	0,13	<b><i>yoxC</i></b>	Desconocida
<b>2,07</b>	0,41	<b><i>yqiH</i></b>	Lipoproteína
<b>3,51</b>	0,15	<b><i>yqxl</i></b>	Desconocida
<b>2,64</b>	0,47	<b><i>yqxl / corA</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>5,96</b>	0,23	<b><i>yral</i></b>	Desconocida
<b>2,14</b>	0,21	<b><i>ytxG</i></b>	Desconocida
<b>2,38</b>	0,08	<b><i>ytxH</i></b>	Proteína de estrés
<b>2,74</b>	0,33	<b><i>yuaB</i></b>	Desconocida
<b>4,06</b>	0,05	<b><i>yueB</i></b>	Sistema de secreción ESX
<b>2,49</b>	0,13	<b><i>yufO</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>3,32</b>	0,34	<b><i>yukA</i></b>	Sistema de secreción ESX
<b>2,56</b>	0,33	<b><i>yukB</i></b>	Sistema de secreción ESX
<b>3,50</b>	0,28	<b><i>yukC</i></b>	Sistema de secreción ESX
<b>3,21</b>	0,21	<b><i>yukD</i></b>	Sistema de secreción ESX

3,75	0,44	<i>yurL / frlD</i>	Metabolismo carbohidratos
2,52	0,05	<i>yvcA</i>	Lipoproteína
2,96	0,48	<i>yvcB</i>	Desconocida
2,14	0,15	<i>yvdG / mdxE</i>	Transporte de polisacáridos
4,56	0,39	<i>ywfB / bacA</i>	Producción de antibiótico
4,69	0,06	<i>ywfD / bacC</i>	Producción de antibiótico
5,00	0,06	<i>ywfE / bacD</i>	Producción de antibiótico
2,60	0,05	<i>ywfL / lipL</i>	Biosíntesis de lipoato
3,29	0,13	<i>ywqI</i>	Desconocida
2,13	0,01	<i>ywqJ</i>	Toxina
2,54	0,34	<i>ywqK</i>	Desconocida
2,37	0,04	<i>ywqL / nfi</i>	Endonucleasa V - reparación DNA
2,08	0,32	<i>ywqN</i>	Oxidoreductasa
2,31	0,05	<i>ywsB</i>	Desconocida
6,43	0,25	<i>ywtB / capA</i>	Biosíntesis de PGA
2,28	0,23	<i>yxjI</i>	Desconocida
2,69	0,15	<i>yxzF</i>	Desconocida

**Tabla 20: Genes inhibidos en el mutante 3610 *motAB::tet* a las 6 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) menor o igual a -2,0 y un *p-value* ≤ 0,8. Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
-4,43	0,09	<i>albA</i>	Producción de antibiótico
-4,22	0,03	<i>albB</i>	Producción de antibiótico
-3,34	0,02	<i>albC</i>	Producción de antibiótico
-8,34	0,05	<i>albD</i>	Producción de antibiótico
-3,88	0,02	<i>albG</i>	Producción de antibiótico
-2,25	0,03	<i>bltD</i>	Metabolismo de aminoácidos
-3,17	0,01	<i>gapA</i>	Glicólisis
-2,79	0,46	<i>metS</i>	tRNA sintetasa
-3,47	0,01	<i>motA</i>	Motilidad
-2,14	0,35	<i>ndhF</i>	Bioenergética de la membrana
-2,92	0,04	<i>pksB</i>	Producción de antibiótico
-2,73	0,21	<i>sipW</i>	Peptidasa - secreción de proteínas
-2,09	0,11	<i>speE</i>	Metabolismo de aminoácidos
-2,10	0,19	<i>tagA</i>	Biosíntesis de ácido teicoico
-2,83	0,45	<i>tasA</i>	Esporulación
-2,18	0,10	<i>tpiA</i>	Glicólisis

-3,94	0,11	<i>tyrS</i>	tRNA sintetasa
-2,07	0,41	<i>ydcI / znuC</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
-2,01	0,24	<i>yckK</i>	Histidina kinasa sensora
-3,33	0,16	<i>ydcM / immaA</i>	Metalopectidasa relacionada con función de profagos
-5,07	0,11	<i>yddM</i>	Desconocido
-2,42	0,35	<i>ydfQ</i>	Homeostásis redox
-3,07	0,25	<i>ydiR</i>	Endonucleasa
-2,63	0,08	<i>yggB</i>	Esporulación
-2,13	0,01	<i>yhjM / ntdR</i>	Regulador transcripcional
-3,67	0,07	<i>yjcM</i>	Desconocido
-4,10	0,24	<i>yoeA</i>	Oxidoreductasa
-2,11	0,04	<i>yphB</i>	Desconocido
-3,42	0,09	<i>yphB</i>	Desconocido
-2,13	0,03	<i>yscA</i>	Desconocido
-2,23	0,17	<i>ytsJ</i>	Ciclo ATC
-2,11	0,13	<i>yvfA / epsK</i>	Biosíntesis de EPS
-2,34	0,05	<i>ywhL</i>	Desconocido
-3,28	0,03	<i>ywmE</i>	Desconocido
-2,06	0,23	<i>yybN</i>	Desconocido

**Tabla 21: Genes inducidos en el mutante 3610 *motAB::tet* a las 6 h de cultivo frente al 3610.** Se muestran los genes que presentan una tasa de cambio (fold change) mayor o igual a 2,0 y un *p-value* ≤ 0,8. Se crecen las estirpes en MSgg y se extraen muestras para el microarray 30 min antes del máximo de eDNA en el sobrenadante.

Fold Change	p-value	Gen	Función
4,54	0,28	<i>bpr</i>	Bacilopeptidasa F - metabolismo aminoácidos
4,67	0,01	<i>carA</i>	Biosíntesis arginina
3,32	0,04	<i>cheC</i>	Chemotaxis
2,76	0,27	<i>cheW</i>	Chemotaxis
6,18	0,23	<i>fliP</i>	Motilidad
9,26	0,01	<i>fliZ</i>	Motilidad
2,00	0,12	<i>pel</i>	Pectato liasa
2,62	0,27	<i>pksL</i>	Producción de antibiótico
2,71	0,24	<i>pksM</i>	Producción de antibiótico
5,15	0,49	<i>rpsQ</i>	Proteína ribosomal
4,08	0,07	<i>sigD</i>	Motilidad - regulador transcripcional
2,66	0,16	<i>sigE</i>	Esporulación - regulador transcripcional
3,49	0,01	<i>ssuC</i>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas

<b>2,25</b>	0,46	<b><i>tufA</i></b>	Factor de elongación Tu - traducción
<b>2,72</b>	0,18	<b><i>ycdA</i></b>	Lipoproteína
<b>2,04</b>	0,04	<b><i>yffC</i></b>	Desconocido
<b>2,13</b>	0,04	<b><i>yflT</i></b>	Proteína de estrés
<b>5,93</b>	0,02	<b><i>yitM</i></b>	Desconocido
<b>2,46</b>	0,01	<b><i>yitO</i></b>	Desconocido
<b>3,14</b>	0,01	<b><i>yjiC</i></b>	Antibiótico
<b>3,35</b>	0,21	<b><i>ylaE</i></b>	Desconocido
<b>2,84</b>	0,01	<b><i>ylxH</i></b>	Motilidad
<b>3,73</b>	0,04	<b><i>ylxL / swrB</i></b>	Motilidad - swarming
<b>2,47</b>	0,16	<b><i>ymfG</i></b>	Metabolismo de aminoácidos
<b>2,22</b>	0,28	<b><i>yoaJ</i></b>	Expansina
<b>4,00</b>	0,44	<b><i>yqxI</i></b>	Desconocido
<b>2,12</b>	0,03	<b><i>yqxJ</i></b>	Desconocido
<b>2,78</b>	0,09	<b><i>yraI</i></b>	Desconocido
<b>2,44</b>	0,06	<b><i>yukE</i></b>	Sistema de secreción ESX
<b>2,21</b>	0,15	<b><i>yvaB / azoR2</i></b>	Oxidoreductasa
<b>5,18</b>	0,17	<b><i>yvgW / cadA</i></b>	Transporte / unión de proteínas y lipoproteínas
<b>3,17</b>	0,15	<b><i>ywfF / bacE</i></b>	Exportador de bacilisina
<b>2,15</b>	0,37	<b><i>ywqK</i></b>	Desconocido
<b>2,79</b>	0,14	<b><i>ywqL / nfi</i></b>	Endonucleasa V
<b>12,49</b>	0,19	<b><i>ywsC / capB</i></b>	Biosíntesis de PGA
<b>2,02</b>	0,13	<b><i>ywtA / capC</i></b>	Biosíntesis de PGA
<b>5,11</b>	0,43	<b><i>ywtB / capA</i></b>	Biosíntesis de PGA

## ANEXO III

Vídeos en el CD adjunto.

**Vídeos 1 y 2: Células en movimiento en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610.** Microscopía de fluorescencia, *real-time*, en contraste de fase.

**Vídeo 3: Células en movimiento en los cuerpos aéreos de *B. subtilis* 3610.** Observado con contraste de fase en microscopio de fluorescencia adaptado a la visualización de biopelículas.

**Vídeos 4 y 5: Marcaje de las células con motilidad en los cuerpos aéreos de *B. subtilis*.** Vídeo de la estirpe 3610 Phag-GFP con marcaje verde las células con motilidad. Realizado con técnica de slow-motion en microscopía de fluorescencia.

**Vídeo 6: Detalle de las células con motilidad en los cuerpos aéreos de *B. subtilis*.** Vídeo de la estirpe 3610 Phag-GFP con marcaje verde las células con motilidad. Realizado con técnica de slow-motion en microscopía de fluorescencia.